

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID  
FACULTAD DE MEDICINA**



**Estudio de las Células  
Inmunocompetentes, macrófagos, Células  
Cebadas, de la Angiogénesis y de la  
Linfangiogénesis en la Piel de los Bordes  
Quirúrgicos de Úlceras por Quemaduras**

**TESIS DOCTORAL**

**María José Utrilla Contreras**

**Madrid, 2018**

## **AGRADECIMIENTOS:**

*al Prof. Dr. **Javier Regadera**, por regalarme sus conocimientos, su tiempo, su trabajo, y su paciencia. Sin él esta tesis no hubiese sido posible.*

*al Prof. Dr. **David Hardisson**, por sus valiosos consejos científicos a lo largo del desarrollo de este trabajo.*

*al Dr. **Jesús Valencia**, Cirujano Plástico de la Unidad de Quemados del Hospital La Paz, por su imprescindible colaboración y generosidad.*

*al Dr. **Luis Alberto Condezo-Hoyos**, por ayudarme amablemente con el riguroso análisis estadístico de esta tesis.*

*a la Dra. **Inmaculada Santos Álvarez**, por sus acertadas aportaciones, comentarios y consejos imprescindibles en la elaboración de este trabajo, y siempre con una sonrisa.*

*a Dña. **Carmen Sánchez Palomo**, Técnico Superior de Anatomía Patológica, de la Facultad de Medicina de la UAM, por la calidad de los métodos inmunohistoquímicos y por su gran calidad humana.*

**DEDICATORIA:**

*a mi **familia**, la de sangre y la elegida, cada uno habéis puesto un granito de arena para que hoy sea quién y cómo soy.*

*a mi hija **María** por la aventura en la que nos hemos embarcado.*

<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
EPIDEMIOLOGÍA, CLASIFICACIÓN Y PRINCIPALES COMPLICACIONES DE LAS QUEMADURAS CUTÁNEAS	3
<i>Etiología de las Quemaduras</i>	5
<i>Extensión y Profundidad de las Quemaduras: Clasificación en Grados</i>	5
LESIONES HISTOPATOLÓGICAS DE LAS ÚLCERAS CUTÁNEAS POR QUEMADURAS	7
RESPUESTA INMUNOLÓGICA EN EL PACIENTE QUEMADO	10
<i>Respuesta de Linfocitos T y B en Quemaduras Cutáneas</i>	14
<i>Respuesta de los Macrófagos en Quemaduras Cutáneas</i>	15
<i>Células Cebadas como Coadyuvante en la Respuesta Inflamatorias y Remodelación Tisular del Tejido Conjuntivo</i>	17
ANGIOGÉNESIS	19
LINFANGIOGÉNESIS	22
TRATAMIENTO DE LAS QUEMADURAS CUTÁNEAS	23
FINALIDAD DE LA TESIS DOCTORAL - JUSTIFICACIÓN	24
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>27</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>29</b>
MATERIAL	30
MÉTODOS	30
<i>Métodos de Estudio Histológico General</i>	30
<i>Método Inmunohistoquímico de Streptavidina-Biotina-Peroxidasa (SBP)</i>	31
<i>Método de Cuantificación de Células Inmunocompetentes</i>	33
Software Image J	35
<i>Método Estadístico</i>	36
<i>Técnicas Fotográficas</i>	37
<b>RESULTADOS</b>	<b>38</b>
ESTUDIO DE LA INFILTRACIÓN DE LINFOCITOS T CD3+, MACRÓFAGOS CD68+, Y CÉLULAS CEBADAS TRIPTASA+ EN EL BORDE DE LA ÚLCERA CUTÁNEA POR QUEMADURA	39
<i>Estudio de la Infiltración de Linfocitos T CD3+ en el Borde de la Úlcera Cutánea por Quemadura</i>	42
<i>Distribución del Número de Linfocitos T CD3+ en la Dermis, en Relación a la Distancia del Borde de la Úlcera</i>	44

---

<i>Estudio de la Infiltración de Linfocitos B CD20+ en el Borde de la Úlcera Cutánea por Quemadura</i>	45
<i>Distribución del Número de Linfocitos B CD20+ en la Dermis, en Relación a la Distancia del Borde de la Úlcera</i>	46
<i>Estudio de la Infiltración de Macrófagos CD68+ en el Borde de la Úlcera Cutánea por Quemadura</i>	47
<i>Distribución del Número de Macrófagos CD68+ en la Dermis, en Relación a la Distancia del Borde de la Úlcera</i>	49
<i>Estudio de la Infiltración de Células Cebadas Triptasa+ en el Borde de la Úlcera Cutánea por Quemadura</i>	50
<i>Distribución del Número de Células Cebadas Triptasa+ en la Dermis, en Relación a la Distancia del Borde de la Úlcera</i>	52
<i>Correlaciones de la Distribución de las Células Inmunocompetentes en las Diferentes Regiones de la Dermis, en Relación a la Distancia del Borde de la Úlcera</i>	53
ESTUDIO DE LA ANGIOGÉNESIS Y DE LA LINFANGIOGÉNESIS EN EL BORDE DE LA ÚLCERA CUTÁNEA POR QUEMADURA	64
<i>Estudio de la Distribución de la Microvasculatura Sanguínea y Linfática en el Borde de la Úlcera Cutánea por Quemadura</i>	67
<i>Distribución del Número de Vasos Sanguíneos y Vasos Linfáticos de la Dermis en Relación a la Distancia del Borde de la Úlcera</i>	70
<b>DISCUSIÓN</b>	71
<b>CONCLUSIONES</b>	84
<b>RESUMEN</b>	87
<b>SUMMARY</b>	90
<b>REFERENCIAS</b>	93

## INTRODUCCIÓN

Una quemadura, según la Organización Mundial de la Salud, es una lesión de la piel u otro tejido causada principalmente por el calor o la radiación, fuego, líquidos calientes, electricidad, la fricción o por contacto con productos químicos.<sup>105</sup> El mecanismo de la lesión se puede utilizar como un predictor del resultado.<sup>12,132</sup>

La quemadura es una lesión traumática común que provoca una considerable morbilidad y mortalidad.<sup>12,122</sup> El paciente quemado es un paciente complejo por las repercusiones vitales, funcionales, estéticas y psicológicas que se presentan como consecuencia de la situación clínica ocasionada por la quemadura.<sup>33,72</sup> Sin duda, las quemaduras se encuentran entre las lesiones traumáticas que suponen un mayor coste sociosanitario,<sup>86</sup> debido a la larga hospitalización y al costoso proceso de rehabilitación.<sup>12,56,122</sup> El paciente con quemaduras extensas y profundas es un paciente crítico, que generalmente precisa ser hospitalizado en una unidad de grandes quemados, en las que exista un control muy exhaustivo por especialistas en cuidados intensivos que, después de una evaluación de los niveles de electrolitos y del estado de hidratación, instauren un rápido tratamiento para mantener las constantes vitales,<sup>20,117</sup> siendo necesario un conocimiento preciso de los diferentes mecanismos fisiopatológicos, con el fin de aplicar un tratamiento médico-quirúrgico adecuado, que disminuya la alta mortalidad y minimice las complicaciones del paciente quemado.<sup>153</sup>

Aunque la morbilidad y mortalidad del paciente con quemaduras de alto grado y extensas áreas quemadas sigue siendo muy alta, en los últimos años se ha reducido gracias a los avances de soporte vital, el mejor manejo de la lesión por inhalación, soporte nutricional eficaz, adecuada prevención y control de las complicaciones infecciosas y de la sepsis, tan frecuentes en los pacientes quemados,<sup>51</sup> así como los avances de las técnicas quirúrgicas para la cicatrización de las zonas quemadas. El manejo de las heridas de los pacientes quemados supone un reto para los cirujanos plásticos. Los avances en los procedimientos quirúrgicos, en el tratamiento de la quemadura y en la reconstrucción de la misma, han mejorado los resultados de estos pacientes, así como su calidad de vida.<sup>49,117</sup> Sin embargo, asociado a la mayor supervivencia de estos pacientes, han aumentado también las complicaciones, como el riesgo de infecciones nosocomiales, sepsis, síndrome

compartimental y de fenómenos tromboembólicos, que requieren ajustes en el tratamiento, para mantener la calidad de vida tras sufrir la quemadura. En los últimos años se han publicado artículos que resaltan el creciente número de avances en los cuidados de la quemadura e ilustran la evolución en este campo para ayudar a los cirujanos que se dedican al manejo del paciente quemado.<sup>175</sup>

Las quemaduras graves causan múltiples anomalías metabólicas que contribuyen a la morbilidad y al fallo multiorgánico que presentan estos pacientes.<sup>65,127,142</sup> El manejo precoz de los pacientes quemados graves requiere desbridamiento, colocación de injertos y realización de colgajos, con el fin de procurar el cierre de la superficie cutánea dañada, siendo a veces necesario, durante los sucesivos tratamientos quirúrgicos, la utilización de vías centrales y, en algunos casos, la realización de traqueotomía y la colocación de una sonda de alimentación nasogástrica, y en ocasiones realización de fasciectomías descompresivas en los síndromes compartimentales, secundarios al edema masivo que puede presentar el paciente quemado en la fase aguda.<sup>133</sup> Además, es fundamental hacer la evaluación microbiológica de los exudados de la herida por quemadura para detectar precozmente las complicaciones infecciosas derivadas de esta situación.<sup>159</sup> Gracias a estos estrictos protocolos terapéuticos, en los últimos 50 años el tratamiento de las quemaduras ha ido evolucionando, dando como resultado, una mayor supervivencia y mejor calidad de vida de los pacientes.<sup>132</sup>

## **EPIDEMIOLOGÍA, CLASIFICACIÓN Y PRINCIPALES COMPLICACIONES DE LAS QUEMADURAS CUTÁNEAS**

No existen datos exactos concluyentes sobre la incidencia de lesiones por quemadura y esto depende, en parte, de los sistemas de clasificación. En la Unión Europea, las cifras de incidencia de quemaduras graves son variables, debido fundamentalmente a que no existen registros generales de lesiones traumáticas.<sup>12</sup> Epidemiológicamente se estima que anualmente unos 6 millones de pacientes con quemaduras requieren tratamiento médico, aunque la mayoría son tratados de manera ambulatoria.<sup>145</sup> La necesidad de recibir tratamiento hospitalario en una Unidad de Quemados especializada depende, principalmente, de la gravedad de la quemadura, del trauma concomitante y de las



condiciones generales de los pacientes.<sup>6,19</sup> Un informe realizado en Estados Unidos estimó que un millón de personas al año precisaron atención médica por quemaduras, de ellos, 50 mil se hospitalizaron, y el 21% precisaron ingreso en una Unidad de Quemados. La quemadura se produjo por fuego o llama (mortales en el 6,1%) y por objetos o líquidos calientes (mortales en el 0,6%); las quemaduras representaron el 2,4% de todos los casos de traumatismos y fueron responsables del 1,6% de las muertes traumáticas.<sup>37</sup> En España y países de nuestro entorno, se estima que la incidencia de quemados es de 300 pacientes por cien mil habitantes y por año, de los cuales más de una tercera parte precisa ingreso hospitalario.<sup>40</sup>

Las quemaduras graves son más frecuentes en hombres que en mujeres (67%), y su mayor incidencia ocurre en adultos jóvenes (20-29 años), seguidos de los niños menores de 9 años. Las personas mayores de 50 años presentan la menor incidencia de lesiones por quemaduras graves (2,3%).<sup>10</sup> En las quemaduras graves, las causas principales de lesiones son por llama (37%) y por escaldaduras por líquidos (24%). En menores de 2 años, las causas más frecuentes de quemaduras son por escaldaduras, y lesiones superficiales por líquidos calientes;<sup>34</sup> sin embargo, en niños mayores de 2 años, las quemaduras por llama son la causa más común de lesiones graves, lo que representa casi un tercio de todas las quemaduras graves. Sin embargo, son significativamente infrecuentes las quemaduras por frío en comparación con otro tipo de heridas por quemadura.<sup>97</sup> En las personas mayores de 80 años, la exposición a una superficie caliente supone la causa más importante de quemadura grave (22%).<sup>6,10</sup>

La supervivencia de los pacientes quemados se relaciona con los siguientes factores: la extensión de la quemadura, la profundidad, la edad, la presencia de lesión por inhalación, y la co-morbilidad del paciente.<sup>12</sup>

En la actualidad existen datos epidemiológicos que indican una disminución de la incidencia de quemaduras, y paralelamente de su morbilidad y mortalidad. La mejoría de estos resultados se relaciona con una mayor concienciación ciudadana en la prevención de las quemaduras y de los avances en el manejo terapéutico de estos pacientes.<sup>117</sup>

## ***Etiología de las Quemaduras***

Las quemaduras pueden producirse por agentes muy variados, y se agrupan en tres grandes grupos: quemaduras térmicas, quemaduras químicas y quemaduras eléctricas.

Las quemaduras térmicas, son las más frecuentes, y se clasifican en tres subgrupos: *quemaduras por contacto* que, a su vez, pueden ser con un sólido caliente o con un líquido caliente, *quemaduras por llama* que, cuando se producen en espacios cerrados, se asocian a menudo a lesiones pulmonares por inhalación de humos, y *quemaduras por radiación*, fundamentalmente por los rayos ultravioleta tras exposiciones solares, también por radiaciones ionizantes. Las quemaduras químicas pueden ser: quemaduras por ácidos y quemaduras por bases o álcalis. Las quemaduras eléctricas pueden ser: quemaduras por flash eléctrico y quemaduras con paso de corriente a través del cuerpo. Las quemaduras por llama y las escaldaduras por líquidos calientes son las más frecuentes en nuestro entorno.

## ***Extensión y Profundidad de las Quemaduras: Clasificación en Grados***

La extensión y profundidad de la quemadura, junto a la edad del paciente, etiología de la quemadura y lesiones asociadas, constituyen los principales elementos que determinan la gravedad del paciente quemado, su pronóstico vital y también las secuelas funcionales.<sup>63</sup>

La extensión de las quemaduras se expresa en porcentajes de superficie corporal afectada. Para calcularlo se utiliza la regla de los nueve de Wallace que es el método más extendido para el cálculo rápido de superficie corporal quemada. La extensión y profundidad de las quemaduras van a determinar la necesidad de realizar procedimientos quirúrgicos en el tratamiento de las mismas.

En función de la profundidad, se clasifican en: quemaduras de primer grado, de segundo grado, de tercer grado y de cuarto grado. En los últimos años, a la clasificación tradicional en grados de profundidad, se añaden otros términos histológicos descriptivos, que pueden determinar el tipo de intervención quirúrgica. Atendiendo a esta descripción histológica, se puede designar también la profundidad de las quemaduras en: superficiales, superficiales de espesor parcial, y de espesor completo.<sup>63</sup>

**Quemaduras de primer grado (superficiales).** Son las más superficiales y dolorosas. Las lesiones cutáneas y mucosas son superficiales y el daño epitelial de la epidermis es menor. Esta lesión se caracteriza por un enrojecimiento de la piel y dolor local. No se forman ampollas, se conserva en gran parte la sensibilidad cutánea y de las mucosas afectadas, y la discriminación entre dos puntos se mantiene intacta. Debido a que la barrera epidérmica no se altera, la respuesta metabólica y el riesgo de infección es mínimo. La más frecuente de las quemaduras de primer grado son producidas por el sol. La curación se produce después de varios días, sin dejar cicatriz.<sup>34,63</sup>

**Quemaduras de segundo grado (dérmicas superficiales de espesor parcial).** Son más profundas, afectan a la epidermis y a la dermis papilar y, frecuentemente, son causadas por escaldaduras. Estas quemaduras son de color rosado, húmedas y dolorosas. Se caracterizan por producir ampollas de pared fina, llenas de exudado, con tendencia a romperse. Curan en 2-3 semanas, por reepitelización con secuelas como la despigmentación. Si se afecta la dermis reticular (dérmicas profundas),<sup>34</sup> el color de la piel es rojizo y el relleno capilar es lento. Son hipoalgésicas o hiperalgésicas. La curación se produce en 3-6 semanas, y la reparación de la quemadura se produce espontáneamente, sin necesidad de realizar injertos cutáneos, siendo infrecuente la formación de una cicatriz hipertrófica,<sup>171,173</sup> y menos frecuente el desarrollo de un queloide.<sup>99</sup> Es típica de la llama.

**Quemaduras de tercer grado (de espesor completo).** La quemadura afecta a todo el espesor de la piel, con destrucción de la epidermis y la dermis, incluida la red capilar, folículos pilosos y tejido glandular de la piel.<sup>63</sup> La piel quemada tiene un aspecto blanquecino, con los vasos coagulados, y se acompaña de una anestesia local. Las causas más habituales de quemaduras de tercer grado son las escaldaduras por inmersión, las lesiones por llama, las originadas por productos químicos y las ocasionadas por descargas eléctricas de alta tensión. Si la lesión es pequeña, puede curar por contracción de los tejidos circundantes; pero muy frecuentemente requerirá un injerto cutáneo.<sup>34</sup>

**Quemaduras de cuarto grado.** Provocan la destrucción de todo el espesor de la piel y del tejido subcutáneo, con afectación de las fascias musculares, pudiendo extenderse a los músculos, a los huesos y a otras estructuras profundas. Las quemaduras de cuarto grado son

el resultado de la exposición prolongada a las causas usuales de quemaduras de tercer grado. Estas lesiones requieren un amplio desbridamiento quirúrgico y una reconstrucción compleja, e invariablemente conllevan una incapacidad prolongada.<sup>63</sup>

## LESIONES HISTOPATOLÓGICAS DE LAS ÚLCERAS CUTÁNEAS POR QUEMADURAS

Los mecanismos fisiopatológicos de las quemaduras cutáneas son muy complejos<sup>153</sup> dado que las lesiones afectan no sólo a la piel, sino a los músculos y huesos subyacentes, y también a órganos internos de especial importancia homeostática. Tras producirse una quemadura, la destrucción celular causada por la agresión térmica genera toxinas y activa la liberación de mediadores inflamatorios, desencadenándose una respuesta inflamatoria con efectos, tanto a nivel local como sistémico, cuando la extensión de la quemadura cutánea es superior al 25-30% de la superficie corporal.<sup>39,81</sup> Debido al efecto directo del calor, la alteración inmediata más importante es una afectación de la microcirculación, desencadenándose un proceso inflamatorio local, que se acompaña de la aparición de edema, como consecuencia de un aumento de la permeabilidad de la microcirculación. El calor produce desnaturalización de las proteínas y destrucción de la barrera cutánea, lo que condiciona una deshidratación por gran pérdida de líquidos y electrolitos.<sup>26</sup> De esta manera, se produce un estado de hipercatabolismo local, que finalmente tenderá a generalizarse. Es un hecho bien conocido que en las quemaduras cutáneas se produce una necrosis coagulativa de la epidermis, de la dermis e, incluso, de los tejidos más profundos (fascia, músculos y hueso).<sup>69,81</sup>

En las quemaduras cutáneas graves se reconocen tres zonas diferentes de lesión, según la gravedad de destrucción del tejido y de las alteraciones del flujo sanguíneo:

**Zona de coagulación:** es la zona central de la lesión, en la que se produce una desnaturalización, degradación y coagulación de las proteínas, dando lugar a un daño tisular inmediato e irreversible.<sup>53,117</sup>

**Zona de estasis:** es la zona alrededor del área de coagulación, y se caracteriza por una disminución de la perfusión del tejido, asociándose un aumento de la permeabilidad vascular, y daño de la microvasculatura sanguínea<sup>26</sup> y linfática.<sup>96</sup> Si la perfusión tisular se

restituye de manera precoz, puede repararse la lesión, pero también puede evolucionar hacia la necrosis completa de la piel cuando la perfusión no se restablece precozmente.

**Zona de hiperemia:** es la zona más periférica de la lesión. Esta región presenta una importante vasodilatación, los tejidos son viables y no existe riesgo de necrosis. Generalmente, el área de hiperemia se recupera completamente.<sup>53</sup>

Este daño tisular produce una reacción inflamatoria local mediada por la liberación de histamina y quininas (prostaglandinas, óxido nítrico),<sup>34</sup> que determina un aumento de la permeabilidad capilar, la cual da lugar al edema y a la formación de flictenas. A la reacción inflamatoria local se suma una respuesta inflamatoria sistémica mediada por interleucinas 1, 6 y 8, lo que origina un aumento de la permeabilidad capilar dando lugar a alteraciones en otros órganos.<sup>38,111</sup>

En las quemaduras que afectan a más del 20% de la superficie corporal, la lesión tisular genera una respuesta inflamatoria sistémica<sup>117</sup> por liberación masiva de mediadores inflamatorios, con repercusión negativa que afecta prácticamente a la totalidad de los órganos y sistemas (corazón, pulmones, riñones, suprarrenales, intestinos y sistema nervioso). La magnitud de dichas alteraciones depende de la profundidad y de la extensión de la quemadura.<sup>68</sup> En el paciente quemado, la fuente de todas estas alteraciones es la propia quemadura; por tanto, una valoración adecuada de la misma, el conocimiento de estas alteraciones sistémicas, y su tratamiento precoz conllevará una mejora de la supervivencia y una disminución de la morbilidad.<sup>153</sup>

Durante las primeras horas de la quemadura, los pacientes presentan un cuadro clínico secundario a la respuesta inflamatoria sistémica, caracterizado por un aumento de la permeabilidad de la microcirculación, no sólo de la zona quemada, sino también en todo el organismo, dando lugar a un desplazamiento rápido de los líquidos corporales, electrolitos y proteínas hacia el espacio intersticial,<sup>26</sup> con la consiguiente dificultad de la perfusión tisular, que puede ser tan intensa que produzca una de las complicaciones más graves del paciente quemado: el shock hipovolémico.<sup>6</sup> A diferencia de otras patologías que cursan con shock hipovolémico, en las quemaduras, el shock inicial se acompaña de la formación de edema.<sup>26</sup>

El edema se produce como consecuencia del cambio de las diferentes presiones entre los capilares y el espacio intersticial.<sup>96</sup> En los capilares, se produce un aumento de presión hidrostática y una disminución de la presión oncótica, inducida también por mediadores inflamatorios, y de otra parte, en el intersticio se produce una disminución de la presión hidrostática y aumento de la oncótica, debida a la liberación de componentes osmóticamente activos procedentes de la destrucción celular. Como consecuencia de todo ello, se produce mayor depleción del volumen plasmático e hipovolemia, característica de la fase aguda de las quemaduras graves.<sup>117</sup> En el desarrollo del edema también participan alteraciones de la circulación linfática,<sup>135</sup> que tiene singular importancia en la regulación de la dinámica intersticial, transportando líquidos y proteínas, desde el espacio extravascular nuevamente hacia la circulación linfática.<sup>72</sup> De hecho, durante la etapa inicial de las quemaduras, la circulación linfática aumenta entre cinco y diez veces; sin embargo, el flujo linfático disminuye significativamente, durante la fase subaguda de las quemaduras, paralelamente a la disminución de la degradación del fibrinógeno y de la activación de la cascada de la coagulación.<sup>26</sup> En definitiva, el edema masivo se produce a los treinta minutos, y alcanzará su máxima intensidad entre las 18 y las 24 horas después de producirse la quemadura. En los casos más graves, el edema generalizado puede prolongarse en el tiempo, sobre todo si el paciente ha presentado una lesión inhalatoria.<sup>168</sup>

En los pacientes quemados críticos con frecuencia se producen, además de trastornos hemodinámicos, trastornos vasculares, como trombosis venosas profundas o fenómenos tromboembólicos<sup>135,138</sup> que pueden ocasionar daños en territorios vasculares vitales. Existen también numerosos factores que determinan una disminución de la perfusión sanguínea. Así mismo, debido a factores que condicionan cambios hematológicos importantes,<sup>162</sup> se producen alteraciones hematopoyéticas de la serie eritrocítica, siendo muy frecuente el desarrollo de anemia, además de cambios en la serie mieloide, con activación de la leucopoyesis, que condicionan la alta leucocitosis, presente ya desde las primeras horas tras la quemadura.<sup>104</sup> Habitualmente también existen trastornos importantes de los mecanismos de coagulación y de la función plaquetaria.<sup>152</sup>

En el paciente quemado grave se producen también alteraciones metabólicas muy importantes, que contribuyen de manera significativa a la morbilidad en el paciente quemado crítico; tras producirse la quemadura, el organismo responde con una serie de alteraciones hormonales que comienzan por un aumento de catecolaminas, glucagón, ACTH, cortisol y mediadores de la inflamación. De este modo, el metabolismo de estos pacientes aumenta considerablemente y este incremento está asociado a una liberación exagerada de catecolaminas. La glucosa, principal nutriente de los tejidos quemados y de las células encargadas de la cicatrización, incrementa sus niveles plasmáticos tras la lesión y se desarrolla una resistencia a la insulina que condiciona hiperglucemia.<sup>72</sup>

Las complicaciones respiratorias en el paciente quemado pueden aparecer con diferente cronología y distintos mecanismos fisiopatológicos: lesión térmica de la vía aérea que compromete la permeabilidad de la misma, provocando incluso fallecimiento inmediato por asfixia, lesión química pulmonar por tóxicos inhalados,<sup>21</sup> lesión pulmonar de origen endógeno en paciente con quemaduras extensas por incremento de la permeabilidad capilar a nivel bronquial que produce edema bronquial y obstrucción de las vías respiratorias.<sup>1</sup>

El sistema nervioso periférico suele estar afectado por la quemadura. El calor, junto con el edema y las sustancias vasoactivas, provocan una estimulación de las terminaciones nerviosas, apareciendo un dolor intenso. El dolor puede llegar a desaparecer cuando dichas terminaciones nerviosas han sido destruidas, entonces se produce una anestesia regional.<sup>63</sup>

## **RESPUESTA INMUNOLÓGICA EN EL PACIENTE QUEMADO**

El paciente quemado experimenta, desde el mismo momento de producirse la quemadura, alteraciones importantes en su sistema de defensa. La destrucción de la barrera cutánea conduce a la pérdida de la regulación normal del metabolismo hidroelectrolítico,<sup>102</sup> así como a una disfunción de los mecanismos inmunológicos. En los primeros momentos de las quemaduras graves, se induce una respuesta inflamatoria sistémica compleja,<sup>130</sup> que comienza por la denominada fase aguda prolongada (aproximadamente 4-8 horas después del inicio de la quemadura). En esta fase se produce un incremento significativo de la proteína C reactiva<sup>150</sup> y del complemento sérico (fundamentalmente C3, C4 y C5).<sup>67</sup> La

activación de las fracciones del complemento C3 y C5, así como la producción de inmunoglobulina IgE provocan una alteración de los mecanismos de la regulación funcional que afectan fundamentalmente a las subpoblaciones linfocitarias. También causan deficiencias en los mecanismos de fagocitosis, alteraciones en la expresión y producción de citoquinas, moléculas de adhesión y en la presentación de antígenos leucocitarios, que, junto con la producción de radicales libres, hacen del paciente quemado un paciente inmunocomprometido, propenso al desarrollo de infecciones.<sup>27,110,149</sup>

Si bien la mayoría de los pacientes quemados son previamente individuos sanos, con su sistema inmune perfectamente bien regulado, cuando se produce la quemadura grave, se desencadena rápidamente una inmunodeficiencia, apareciendo alteraciones de la regulación inmunológica local, fundamentalmente en las áreas de la piel dañadas,<sup>11,31,90,98,118</sup> así como una supresión de las funciones del sistema inmunológico sistémico, que predispone al paciente al desarrollo de complicaciones, incluidas las secundarias a la infección producidas por gérmenes altamente patógenos (*Pseudomona aeruginosa*),<sup>24,167</sup> que con frecuencia desencadenan un shock séptico<sup>5,61</sup> que puede conducir a un fracaso multiorgánico y finalmente al fallecimiento del paciente.<sup>78,101,170</sup> La infección y la sepsis son las complicaciones más frecuentes y más graves durante la fase inmunosupresora de la respuesta inflamatoria sistémica, pero también las quemaduras menos graves predisponen al desarrollo de alteraciones de la inmunidad a largo plazo.<sup>32</sup>

La sepsis constituye la principal causa de mortalidad retardada en la Unidad de Cuidados Intensivos, y se produce por una respuesta hiperinflamatoria en la etapa temprana, seguida por un período de inmunosupresión. Este hecho determina una respuesta inflamatoria inadecuada que afecta negativamente al proceso de cicatrización de la herida, y además ejerce efectos deletéreos sistémicos en el paciente.<sup>68</sup> Se cree que este trastorno inmune es un factor que está estrechamente asociado con una alta mortalidad.

Se sabe que la piel normal constituye una barrera contra las infecciones y cuando se producen lesiones tisulares se desencadenan mecanismos inmunológicos de respuesta innata y adaptativa.<sup>8</sup> La respuesta inmunitaria de la piel se produce por una activación de las células dendríticas y de las células de Langerhans ubicadas en la epidermis, que participan en



los mecanismos de presentación de antígenos a los linfocitos T cutáneos, y a los linfocitos de los ganglios linfáticos locales.<sup>79,80,109,151</sup> Los linfocitos T inducen la liberación de varias citoquinas, como las interleucinas IL1, IL3, IL6<sup>96</sup> y el factor estimulante de colonias de granulocitos-monocitos,<sup>164</sup> que son mediadores fundamentales para la activación de las respuestas inmunes, tanto innatas como adquiridas.<sup>154</sup> Para la inducción y regulación de respuesta inmunitaria es imprescindible la participación de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad,<sup>67</sup> moléculas que se expresan en la superficie de diversas células, que inducen una respuesta inmune específica a través de la presentación del antígeno a las células T.

Está descrito que las células dendríticas desempeñan un papel fundamental en la protección del huésped frente a las infecciones.<sup>35</sup> Después de una lesión por quemadura grave, se observa una supresión de la inmunidad, por alteración en la función de las células de Langerhans epidérmicas y de las células dendríticas dérmicas, que condiciona una fuerte reducción de la activación de linfocitos T.<sup>151</sup> De hecho, las células T CD4+, activadas por estas células dendríticas defectuosas, tienen una capacidad limitada para secretar citoquinas proinflamatorias (IFN- $\alpha$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ ) y para activar la proliferación de células T.<sup>131</sup> Recientemente se han desarrollado tratamientos de inmunoterapia con células dendríticas, dirigidas a promover su capacidad para desencadenar la inmunidad de las células T. Esta novedosa indicación terapéutica puede representar una estrategia para mejorar las defensas inmunitarias contra la infección, después de una lesión por quemadura.<sup>131</sup> Las células dendríticas desempeñan un papel muy importante en la aceleración de los procesos de cicatrización inicial de la herida,<sup>17</sup> y ello es debido probablemente por la secreción de factores que desencadenan la proliferación de las células mesenquimales que median la cicatrización de heridas.<sup>154</sup>

En los pacientes quemados es fundamental una estricta regulación del sistema inmunológico general del paciente, pero a la vez una perfecta regulación de la respuesta inmunológica a nivel del aparato digestivo y del pulmón, ya que se han demostrado alteraciones específicas en estos sistemas que influyen en la evolución general de los pacientes.<sup>113</sup> En este sentido, las células T pueden jugar un papel importante en el sistema

de barrera inmune intestinal después de lesiones por quemaduras graves.<sup>174</sup> Además, la inhalación de humo, tan frecuente en las quemaduras por llama, altera sustancialmente los mecanismos inmunológicos del pulmón,<sup>1</sup> de modo que en estos casos, un modelo de quemadura en rata ha demostrado un aumento de los niveles circulantes de interleucina-6 (IL-6), factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). En este estudio se evaluó inmunohistoquímicamente el inmunofenotipo de los infiltrados inflamatorios en los pulmones, encontrándose en los casos de quemaduras graves, un incremento de los linfocitos CD3+ y de los macrófagos CD68+.

En definitiva, en relación con los mecanismos inmunológicos de las quemaduras cutáneas, durante la fase aguda los neutrófilos producen una liberación de la cascada pro-inflamatoria, secretándose citoquinas principalmente interleucinas y TNF, moléculas que pueden estar implicadas en el desencadenamiento de un shock séptico.<sup>3,96,101,127</sup> Posteriormente se inician los mecanismos de reparación tisular en los que participan numerosas células inflamatorias, fibroblastos, miofibroblastos y numerosas moléculas, resultado de la activación de varias vías de señalización intracelular.<sup>48</sup> Estos procesos reparativos de las quemaduras cutáneas se asocian al progresivo restablecimiento del equilibrio homeostático -metabólico e inmunológico- del paciente quemado.<sup>38</sup>

En la actualidad, se ha identificado un nuevo concepto de inflamación denominado inflammasoma, caracterizada por el conjunto de respuestas inmunológicas y de la matriz extracelular del tejido conjuntivo, que participa en los mecanismos inflamatorios agudos y en los mecanismos de reparación tisular.<sup>100,126</sup> El inflammasoma se activa en respuesta a un patógeno o peligro endógeno que desencadena señales celulares y moleculares mediadoras de las reacciones inflamatorias.<sup>100</sup> Formando parte del inflammasoma, no solo se van a encontrar las células inmunocompetentes, fundamentalmente linfocitos T, sino también macrófagos con actividad fagocítica y macrófagos presentadores de antígenos,<sup>84</sup> los cuales son células fundamentales en el papel protector de la respuesta del huésped a una lesión por quemadura grave.<sup>100</sup>

## ***Respuesta de Linfocitos T y B en Quemaduras Cutáneas***

Se sabe que los linfocitos T constituyen una población celular muy heterogénea que posee en su superficie múltiples marcadores, pero todas las células T presentan el antígeno CD3 en la superficie de la membrana citoplasmática (“epítotope de membrana”), que está involucrado en la transmisión de las señales de activación de los linfocitos T. Dentro de las células T CD3+, se incluyen dos subpoblaciones linfocitarias:<sup>80</sup> los linfocitos T CD4+ y los linfocitos T CD8+. <sup>155,157</sup> Los linfocitos T CD4+ (linfocitos helper/inductores, Th) desempeñan una importante función en el inicio y el desarrollo de la respuesta inmune. De otra parte, la activación de la subpoblación de linfocitos T CD8+ (linfocitos T citotóxicos, Tc) determina los mecanismos de citotoxicidad, propios de la respuesta inmune celular, segregando toxinas al contacto específico con células diana, y determinando la destrucción de dichas células.

Los linfocitos B son esenciales para los mecanismos de respuesta inmunitaria. La activación de las células B se adapta al tipo de patógeno y se ve facilitada por la ayuda de células T. Los linfocitos B activados no sólo producen anticuerpos, sino que también producen una variedad de citoquinas para potenciar y suprimir la respuesta inmune. No es de extrañar que las células B desempeñen múltiples funciones, tanto en la respuesta inmune humoral como celular, durante la infección y la patogénesis autoinmune.<sup>64</sup>

La lesión térmica producida por las quemaduras cutáneas induce fundamentalmente cambios de la respuesta inmunológica celular.<sup>60</sup> Las quemaduras determinan inicialmente una reducción de linfocitos, que es la consecuencia de una respuesta adaptativa del organismo más que una linfopenia absoluta, dado que se produce una redistribución de estas células hacia el foco de la úlcera cutánea y a los tejidos circulares. El efecto inmunosupresor de las quemaduras graves es conocido desde hace años; en concreto, en las primeras 24 horas de la quemadura se produce una reducción del número de células CD3+ y de la relación CD4/CD8.<sup>128</sup> Se produce una respuesta defectuosa de los linfocitos T, con alteraciones de las vías de señalización CD3 y con el aumento de la producción de IFN-gamma y de NO,<sup>31</sup> con una evidente depleción de linfocitos T CD3+,<sup>160</sup> así como cambios en la respuesta de las células T CD4 y CD8 séricas,<sup>163</sup> cuya proporción cambia en los pacientes quemados.<sup>108</sup> En un modelo experimental de quemadura desarrollado en ratones, se ha

visto un incremento del número de Linfocitos T en la piel, que expresan un inmunofenotipo de células CD8+, o CD8-CD4,<sup>157</sup> que representa un característico inmnofenotipo supresor.<sup>80,108</sup>

### ***Respuesta de los Macrófagos en Quemaduras Cutáneas***

Los macrófagos tienen dos funciones fundamentales: una de ellas está relacionada con las respuestas de inmunidad innata en los procesos de fagocitosis y destrucción de microorganismos, participando en la respuesta inflamatoria inespecífica; y, por otra parte, son células presentadoras de antígeno, por lo que participan en la inmunidad adaptativa.<sup>8</sup> Los macrófagos se han clasificado, según sus propiedades funcionales, en dos subpoblaciones: **macrófagos M1**, que secretan predominantemente mediadores pro-inflamatorios, que desencadenan y amplifican las respuestas inflamatorias,<sup>91</sup> y presentan funciones bactericidas y antitumorales,<sup>138</sup> liberando radicales de oxígeno (ROS), y **macrófagos M2**, que producen principalmente mediadores antiinflamatorios, y por ello desempeñan un papel importante en los mecanismos de cicatrización de heridas y en los de angiogénesis.<sup>77,91,138,172</sup> Se sabe que los monocitos son efectores y reguladores críticos de la respuesta inmunológica. Un monocito tiene el potencial para diferenciarse en células dendríticas o macrófagos, y este comportamiento se ha visto implicado en determinados cambios significativos, tanto en pacientes como en ratones gravemente quemados.<sup>158</sup> Se ha propuesto como biomarcador en los pacientes quemados el uso del denominado Factor inhibidor de la migración de los macrófagos; se trata de un biomarcador muy prometedor, ya que está implicado en enfermedades de tipo inflamatorio como la sepsis, las infecciones sistémicas y las enfermedades autoinmunes.<sup>52</sup>

Los macrófagos M1 son inducidos por IFN- $\gamma$  y por TNF- $\alpha$  producido por células Th1, T citotóxicas CD8+ y células NK y muestran un fenotipo tipo Th1. Esta activación clásica, o polarización M1, se caracteriza por la secreción de elevados niveles de IL-12 e IL-23 y bajos niveles de IL-10. Por otro lado, en respuesta a las citoquinas Th2 IL-4 e IL-13, los macrófagos se pueden activar de manera "alternativa", también llamada polarización M2. En estas condiciones, producen grandes cantidades de IL-10 y TGF $\beta$  y bajos niveles de IL-12. Los macrófagos, además de citoquinas, producen mediadores inflamatorios derivados del ácido

araquidónico: prostaglandinas D2, E1, E2 y leucotrienos B4 y C4 y derivados del oxígeno (ion superóxido,  $H_2O_2$ ), liberando factores de crecimiento que facilitan la reparación tisular y la angiogénesis.<sup>138</sup>

En las úlceras cutáneas por quemaduras, durante la fase aguda de la quemadura, desde los primeros minutos de la agresión térmica y hasta las 10-12 horas de evolución de la misma, con la degeneración del tejido conjuntivo por el incremento del calor, se desarrolla una importante infiltración de células inflamatorias, leucocitos polimorfonucleares neutrófilos, produciéndose una hidrólisis del ATP de los tejidos quemados.<sup>9</sup> También en esta primera fase de la lesión se observa infiltración de macrófagos.<sup>39,146</sup> Y estos tipos celulares son indispensables para la digestión y eliminación de los detritus necróticos que se producen en las quemaduras. Gracias a la síntesis y secreción de mediadores inflamatorios,<sup>96</sup> el número de macrófagos aumenta extraordinariamente después de la agresión térmica,<sup>103</sup> estos macrófagos producen y liberan  $TNF-\alpha$ , que interviene en la activación, marginación y migración de los leucocitos polimorfonucleares y, a su vez, ejerce un efecto autocrino sobre los propios macrófagos, con lo que se liberan radicales libres y se induce el catabolismo del ácido araquidónico, así como la liberación de prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos y citoquinas, en particular IL-1 e IL-8,<sup>62</sup> lo cual es debido a los factores quimiotácticos liberados como consecuencia de la degradación de los tejidos durante la agresión térmica.<sup>91</sup> En los días sucesivos de la evolución de la quemadura, se produce un incremento y migración de macrófagos y linfocitos, hecho que es muy evidente tres días después de la quemadura; estas células inflamatorias persisten en el foco de la quemadura, para posteriormente, transcurridas dos o tres semanas, disminuir notoriamente.<sup>68</sup>

El marcaje CD68 de macrófagos está relacionado con su capacidad de fagocitosis,<sup>103</sup> ya que CD68 es una glicoproteína de membrana situada en lisosomas y endosomas. El aumento de la intensidad de la reacción inmunohistoquímica a CD68 se relaciona con un aumento del número de vacuolas intracitoplasmáticas y el aumento en el proceso de fagocitosis de detritus celulares en la úlcera cutánea por quemadura.<sup>91</sup> En los casos en los que el tejido quemado no se haya extirpado o en aquellos pacientes en los que se desencadena una infección que afecta los bordes de la úlcera post-quemadura, el proceso inflamatorio es

mucho más intenso y persiste durante más tiempo; de modo que, los macrófagos y los neutrófilos continúan produciendo gran cantidad de mediadores químicos, enzimas y radicales libres de oxígeno, lo que determina la extensión del daño tisular y agrandamiento del lecho quemado. Además, estas sustancias pasan al torrente circulatorio<sup>38</sup> y pueden producir daño en otros órganos, incluso desencadenando la síntesis de tromboxanos y de factores pro-coagulación, que producen trombosis y zonas de infarto en órganos vitales.<sup>62,96,136,138</sup>

### ***Células Cebadas como Coadyuvante en la Respuesta Inflamatoria y Remodelación Tisular del Tejido Conjuntivo***

Las células cebadas -los mastocitos- son esenciales en la regulación de los procesos inflamatorios y alérgicos. De hecho, las células cebadas participan en mecanismos de defensa frente a bacterias y parásitos, y, junto con las células dendríticas y los monocitos, constituyen la primera línea de defensa frente a estos microorganismos.<sup>95</sup> Las células cebadas son abundantes en la dermis cutánea, en la submucosa del tracto digestivo y respiratorio, y también tienen una abundante presencia en la vecindad de la microvasculatura sanguínea y linfática. Las células cebadas participan activamente en la remodelación de los tejidos inflamados y proceso de angiogénesis;<sup>144</sup> también, intervienen en las reacciones de hipersensibilidad tipo I.<sup>70</sup>

Los mastocitos son células altamente heterogéneas con respecto a su morfología, función y productos metabólicos. Los mastocitos contienen enzimas como la triptasa o la quimasa.<sup>144</sup> La triptasa es una de las principales serina-proteinasas localizadas en los gránulos secretores de los mastocitos y se libera a través de la degranulación, que está implicada en la patogénesis de la enfermedad inflamatoria alérgica.<sup>70</sup> De hecho, se ha propuesto el empleo de moléculas que inhiben la triptasa para el tratamiento de estas enfermedades inflamatorias.<sup>95</sup> Los gránulos intracitoplasmáticos de las células cebadas contienen histamina, fundamental en la regulación de los mecanismos de la inflamación; además, los gránulos contienen otras sustancias, entre las que destacan diversas proteasas, siendo características de los mastocitos, la triptasa y las quimasas.<sup>28,29</sup> Está establecido que la triptasa incrementa la permeabilidad vascular y degrada las proteínas de la matriz

extracelular, permitiendo la migración tisular de células inflamatorias; mientras que las quimاس atraen linfocitos, neutrófilos y eosinófilos al foco inflamatorio, y participan también en la reorganización de la matriz extracelular, activando la acción de las metaloproteasas y de otras proteasas de la matriz extracelular, desempeñando un papel fundamental en el tratamiento de la herida postquemadura; de modo que, por ejemplo, una quemadura por escaldadura de segundo grado producida en ratones provoca una respuesta inflamatoria mediada por IgM, asociada con la degranulación temprana de mastocitos.<sup>169</sup>

El traumatismo térmico tiene un efecto directo en los mastocitos, desencadenando la secreción de histamina. Esta secreción conduce a una actividad incrementada de xantina-oxidasa y a un aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno. Los niveles más bajos de histamina y triptasa proporcionan evidencia indirecta de que los ROS están implicados en el proceso, provocando la liberación de tales mediadores por los mastocitos, lo que a su vez puede sugerir que los ROS pueden actuar como estimuladores de la degranulación de los mastocitos en quemaduras.<sup>125</sup> Un trabajo experimental realizado en ratones ha sugerido que las proteasas 4, 5 y 6 de los mastocitos del ratón son mediadores del papel crítico que desempeñan los mastocitos durante la fase proliferativa de la cicatrización.<sup>140</sup>

La activación específica de las células cebadas implica la unión del antígeno a los receptores de IgE de su membrana citoplasmática. De este modo se produce una liberación del contenido de los gránulos hacia el tejido conjuntivo y hacia la pared de los vasos sanguíneos.<sup>140</sup> Con el descubrimiento de la inmunoglobulina E (IgE), se pensó originalmente que la gran mayoría de los episodios anafilácticos se debían al acoplamiento del antígeno con dos moléculas de IgE unidas a células. Más recientemente se ha visto que muchos episodios se producen por activación directa de mastocitos, no implicando la unión del antígeno a la IgE.<sup>75</sup> La activación inespecífica de las células cebadas es consecuencia del reconocimiento de componentes bacterianos. Como respuesta a estos estímulos, los mastocitos pueden producir dos tipos de respuesta, las denominadas respuesta inmediata y la respuesta en fase tardía. La respuesta inmediata libera histamina y la respuesta en fase tardía implica la síntesis de mediadores, como leucotrienos, prostaglandinas y la producción

de muchos tipos de citoquinas. En definitiva, las células cebadas, además de participar en la defensa del organismo, intervienen en la remodelación de tejidos, siendo fundamentales en los mecanismos de reparación tisular de las heridas, dado que la liberación de histamina incrementa la migración y la proliferación de los fibroblastos y los mecanismos de angiogénesis.<sup>143</sup>

Está completamente establecido que los mastocitos tienen un importante papel proangiogénico. Los mastocitos también participan en los mecanismos de proliferación vascular que ocurren en las primeras fases de la reparación de las quemaduras cutáneas, induciendo procesos de angiogénesis e inflamación (semejante a lo que ocurre en la formación de hemangiomas),<sup>141</sup> de modo que, a medida que se produce la fase de reparación y de cicatrización de las úlceras cutáneas por quemaduras, los mastocitos disminuyen desde la fase proliferativa hasta la fase involucionada.<sup>144</sup> Esta fase de reparación tisular está moderada por numerosas moléculas y, entre ellas, recientemente se ha sugerido la modulación de los perfiles de la proteína Anexina A1 que se vincula a procesos de inflamación, proliferación, migración y apoptosis, pudiendo tener efectos terapéuticos en las quemaduras cutáneas.<sup>137</sup>

## ANGIOGÉNESIS

En relación con las quemaduras cutáneas se conocen muy bien los mecanismos inflamatorio e inmunológico y varios modelos experimentales han precisado los cambios cronobiológicos que experimentan las úlceras cutáneas por quemaduras, demostrándose que el número total de macrófagos (CD11b+) y de células CD3+ infiltradas aumenta significativamente en el tercer día, alcanzando su punto máximo al sexto día, para después ir reduciendo progresivamente a partir del décimo día;<sup>121</sup> no obstante, en esa fecha se continúa evidenciando una hiperactividad de los linfocitos T.<sup>25</sup> A los 14 días de la quemadura se produce una mejoría de la respuesta funcional de las células T, sobre todo de las células T de memoria, lo que facilita la reparación de la lesión.<sup>16</sup> En los focos de quemadura ya evolucionada, se observa que en la regulación y cierre progresivo de la lesión participan, entre otros mecanismos, la activación de células NKT.<sup>129</sup>



Sin embargo, una revisión pormenorizada de la literatura nos permite constatar los escasos estudios centrados en mecanismos de angiogénesis en pacientes con quemaduras cutáneas, siendo también escasos los modelos experimentales que evalúan la neovascularización en quemaduras cutáneas. Tanto clínica como histológicamente se aprecia que en los bordes de la úlcera, durante los primeros días tras la agresión térmica cutánea, se produce progresivamente un tejido de granulación, que es el resultado de dos procesos fundamentales en la cicatrización de toda herida: el proceso de fibrogénesis, con depósito de colágeno y de matriz extracelular, y el proceso de angiogénesis,<sup>14</sup> en el que se producen dos fases consecutivas, una primera de proliferación de capilares y vénulas y una segunda de esclerosis vascular, que se incorpora al tejido fibrótico cicatricial.<sup>14</sup>

Los mecanismos de angiogénesis son muy complejos, pero como característica fundamental se puede considerar la generación de nuevos brotes vasculares o angiotubos a partir de vasos capilares y venulares preexistentes.<sup>7,115</sup> En este proceso se identifican varias etapas: en primer lugar ocurre la producción de factores proangiogénicos<sup>94</sup> que determinan la proliferación y migración de las células endoteliales de vasos pre-existentes, procesos que están regulados por numerosas moléculas, entre las que se encuentran varios factores de crecimiento endotelial y vascular,<sup>2</sup> siendo fundamental la secreción del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y de su receptor (VEGF-r); pero también es muy importante la secreción de la angiopoyetina 2, la cual interactúa con el Tie 2, receptor de las células endoteliales. En un modelo experimental de quemaduras de la cara con afectación corneal causada por sustancias alcalinas, la inducción de linfocitos T citotóxicos dirigidos al receptor VEGF-r de tipo 2 inhibe la neovascularización corneal, lo que sugiere la posibilidad de creación de vacunas dirigidas a VEGF-r 2 como nueva estrategia terapéutica para la lesión química corneal.<sup>92</sup> De otra parte, la producción de  $\alpha$ -defensina por queratinocitos epidérmicos humanos normales fue inhibida por células de estirpe CD34 negativas aisladas de sangre periférica de pacientes gravemente quemados. Las células CD34+ obtenidas de pacientes severamente quemados se caracterizaron también como CD31+,<sup>167</sup> asociándose a estos procesos de proliferación de células mesenquimales pluripotenciales CD34+ y de células endoteliales CD31+ su relación con los microvasos neoformados.<sup>45</sup>

Existe evidencia de que las células madre mesenquimales podrían estar ubicadas en el tejido conjuntivo adventicial perivascular de la piel,<sup>74,82</sup> siendo aceptable la sugerencia de que los pericitos de capilares y de vénulas neoformadas durante la angiogénesis pudieran inducir la proliferación de células madre mesenquimales, de modo que éstas podrían migrar hacia las heridas y contribuir a la reparación de los tejidos lesionados.<sup>93</sup> Así mismo, se ha sugerido que esta proliferación de células madre totipotenciales tendrían mecanismos de regulación relacionados con linfocitos CD4+ y CD20+ durante la formación inicial del tejido de granulación;<sup>45</sup> de este modo, al igual que ocurre en los hemangiomas cutáneos,<sup>143</sup> se produce una correlación de los mecanismos inmunológicos y de angiogénesis en los primeros momentos de la respuesta tisular y de la reparación de las quemaduras.<sup>45</sup>

Asociado a los procesos de angiogénesis se van iniciando los mecanismos de cicatrización, que comienzan con la proliferación de fibroblastos y sobre todo de miofibroblastos,<sup>58</sup> los cuales sintetizan fibras de colágeno y numerosas proteínas de matriz extracelular, fundamentalmente metaloproteínas que participan activamente en los mecanismos de regulación del crecimiento vascular. Durante las fases finales de reparación tisular de las quemaduras, el tejido de granulación evoluciona hacia una fibrosis intersticial asociada a estenosis progresiva de los capilares y vénulas neoformadas, de modo que la mayoría de los microvasos aparecen estenosados<sup>42</sup> o completamente ocluidos durante la progresión de la cicatrización, aunque siguen identificándose como estructuras de origen vascular por su expresión de VEGF, PDGF y endotelina 1. En estas áreas de vasos angiogénicos esclerosados se evidencia la proliferación de fibroblastos TGF- $\beta$ 1+ y miofibroblastos alfa actina de musculo liso,<sup>15,156</sup> y estos cambios son aún más evidente cuando se produce una cicatriz hipertrófica.<sup>23,156</sup>

En un modelo porcino de quemaduras cutáneas, se ha sugerido que la aplicación tópica de moléculas relacionadas con los mecanismos de secreción de las células mononucleares puede mejorar la calidad de la regeneración de la piel, aumentar la angiogénesis y reducir la formación de cicatrices después de la lesión, evitando el rechazo y facilitando el prendimiento del injerto de la piel.<sup>49</sup> Sin duda, la respuesta inflamatoria es esencial para conseguir unos adecuados mecanismos de reparación tisular y de cicatrización

de la herida cutánea;<sup>23,47</sup> de manera que, los macrófagos, a través de la transcripción del factor regulador del interferón 8 (IRF8), participan en la coordinación de las fases de la inflamación y la angiogénesis durante una adecuada cicatrización de heridas,<sup>47,48</sup> siendo fundamental una perfecta perfusión vascular, evaluada clínicamente mediante el uso de flujometría láser por Doppler,<sup>57</sup> de los tejidos que rodean los bordes de la úlcera por quemaduras; estos mecanismos son muy semejantes a los que ocurren en las úlceras cutáneas secundarias a la microangiopatía diabética.<sup>71</sup>

## LINFANGIOGÉNESIS

Está bien establecido que los capilares linfáticos participan activamente en la regulación del líquido intersticial que difunde en la matriz extracelular, de modo que el trasudado de plasma y las proteínas extravasadas de los capilares sanguíneos es recogido por las hendiduras linfáticas y por los capilares linfáticos,<sup>4</sup> que transportan la linfa recién recolectada hacia las vénulas y venas linfáticas, para terminar drenando toda la linfa de la circulación linfática del cuerpo humano en el conducto torácico y en la gran vena linfática.<sup>4</sup> Además, los vasos linfáticos tienen una importante función en la regulación de los mecanismos inmunológicos que ocurren en la fase aguda de la formación de úlceras cutáneas y en la fase de reparación de heridas, ya que el endotelio linfático también participa en la presentación del antígeno a las células inmunocompetentes y, asimismo, la circulación linfática dentro de los ganglios linfáticos regionales cumple funciones fundamentales en la proliferación de linfocitos B de los centros germinales y de linfocitos T en la zona paracortical de los ganglios linfáticos.<sup>4</sup>

Los estudios de linfangiogénesis en modelos experimentales de quemaduras cutáneas son muy escasos, y la mayoría de ellos se centran en modelos de linfangiogénesis en úlceras corneales de causas diversas, incluidas quemaduras inducidas por álcalis, en los que la proliferación de capilares linfáticos se ha cuantificado y evaluado el inmunomarcaje con el anticuerpo Live-1, que específicamente se identifica en el citoplasma de las células endoteliales de capilares linfáticos, estando ausente en el endotelio vascular sanguíneo.<sup>106,165</sup> Está claro que la reacción inflamatoria realiza un papel fundamental en la inducción de la neovascularización y linfangiogénesis corneal.<sup>134</sup>

En las quemaduras, los mecanismos de angiogénesis y de linfangiogénesis se producen al comienzo de la reparación de la úlcera cutánea y persisten durante las diferentes fases de la cicatrización, pero generalmente los procesos de angiogénesis preceden unas horas, e incluso uno o dos días, a los mecanismos de linfangiogénesis. También los procesos de linfangiogénesis están regulados por numerosas moléculas, siendo asimismo fundamental la secreción, en el foco de lesión tisular, de varios factores de crecimiento vascular específicos de los vasos linfáticos y distintos a los factores de crecimiento de los vasos sanguíneos. De todos estos factores de crecimiento de vasos linfáticos destaca por su importancia funcional la secreción de VEGF-C y de su receptor específico.<sup>76</sup> Recientemente se están desarrollando nuevas moléculas que producen una evidente inhibición de la inflamación de la córnea suprimiendo la linfangiogénesis, lo que puede ser útil en la prevención del rechazo inmune después de la queratoplastia.<sup>114</sup>

## TRATAMIENTO DE LAS QUEMADURAS CUTÁNEAS

Las heridas por quemaduras frecuentemente requieren tratamientos quirúrgicos. El injerto de piel tiene como objetivo lograr el cierre de la herida, pero requiere un lecho de la herida bien vascularizado y una adecuada activación de la respuesta inmunológica<sup>13</sup> y de los mecanismos de reparación tisular y de cicatrización.<sup>49</sup> Respecto a la indicación de cirugía con injertos cutáneos, en una minoría de casos es suficiente la transferencia de tejido libre; sin embargo, la transferencia de tejido libre exige la presencia de unos vasos adecuados para realizar la anastomosis,<sup>14</sup> y el desbridamiento suficiente del tejido desvitalizado para evitar el riesgo aumentado de infección que tienen estos pacientes. Sin embargo, en las quemaduras profundas y extensas, los colgajos constituyen el método quirúrgico que obtienen los mejores resultados.<sup>59</sup>

Dentro de los numerosos tipos de tratamientos médicos indicados en los pacientes con quemaduras cutáneas, recientemente, entre otras, se ha propuesto el enfriamiento y la eliminación de la energía térmica de los tejidos dañados como terapia beneficiosa en los primeros momentos de la atención en las unidades de quemados.<sup>161</sup> Así mismo, el tratamiento con CO<sub>2</sub> facilita los procesos de angiogénesis alrededor de las úlceras cutáneas por quemaduras,<sup>22</sup> al igual que ocurre con la aplicación de procedimientos físicos mediante

vendajes con presión negativa intermitente local.<sup>55</sup> También, la administración de cimetidina en los pacientes con quemaduras aumenta la respuesta inmune, incrementándose los linfocitos T CD8+ en la sangre periférica.<sup>66</sup>

En las quemaduras cutáneas, el uso de moléculas o fármacos<sup>23</sup> antiinflamatorios y antioxidantes que reducen la actividad de la mieloperoxidasa, los niveles de nitrito, y el número de macrófagos la CD68+ mejoran la curación de heridas por quemadura, mostrando disminución en los parámetros inflamatorios y en daño oxidativo;<sup>30</sup> sin embargo, investigaciones recientes han demostrado que el tratamiento con interleucinas, como puede ser la administración de IL15, no logra mejorar la infección ni los mecanismos implicados en la inmunidad adaptativa y tampoco ha conseguido prevenir la pérdida de CD4+, CD8+, linfocitos B y NK inducida por sepsis en los pacientes con quemaduras.<sup>101</sup>

De otra parte, el tratamiento tópico con eritropoyetina en las quemaduras<sup>147</sup> aceleró su cicatrización a través de la activación de la angiogénesis, de la síntesis de colágeno y de ácido hialurónico, y de la formación de matriz extracelular, estimulándose asimismo la proliferación de queratinocitos y la reepitelización de las úlceras cutáneas.<sup>50</sup>

Recientemente se han investigado los efectos terapéuticos beneficiosos del uso de células madre,<sup>18,41</sup> demostrándose que las células madre promueven una curación mejor y más rápida de las heridas por quemaduras, además de una disminución de los niveles de inflamación, con menor progresión de la cicatriz y fibrosis.<sup>43</sup> Se han llevado a cabo estudios en quemaduras corneales por álcalis, en los que la administración subconjuntival de células madre mesenquimales, ha demostrado acelerar significativamente la cicatrización de la córnea, produciéndose además una reducción de las células infiltradas CD68+,<sup>166</sup> lo que sugiere una acción beneficiosa de la utilización de estas células madre.

## **FINALIDAD DE LA TESIS DOCTORAL – JUSTIFICACIÓN**

El presente estudio se centra, de una parte, en la evaluación de las células inmunocompetentes, de los macrófagos y de las células cebadas en la piel que rodea a la úlcera cutánea por quemadura, y, de otra parte, en la posible participación de los

mecanismos de angiogénesis y de linfangiogénesis, tanto en el lecho periulceroso, como en la dermis de los márgenes de la extirpación quirúrgica de la piel quemada.

La extensa bibliografía centrada en estudios clínicos y bioquímicos que abordan los diferentes mecanismos de inmunosupresión que se producen en los pacientes quemados prueba que existe una afectación tanto de la inmunidad innata como de la adquirida, con alteraciones en la activación y función de los neutrófilos, de los macrófagos, y de los linfocitos T y B. Esta inmunosupresión predispone al desarrollo de infecciones locales que pueden desencadenar una sepsis<sup>11</sup> y, frecuentemente, evolucionar a un fracaso renal y posteriormente a un fallo multiorgánico, causa de la alta morbilidad y mortalidad en los pacientes con quemaduras graves.<sup>46</sup>

Sin embargo, los estudios histopatológicos basados en la detección inmunohistoquímica de células inmunocompetentes y de macrófagos son muy escasos, siendo los datos publicados poco sistemáticos y, a veces, contradictorios; así mismo, aún son más excepcionales los trabajos centrados en el estudio de la migración de las células cebadas en las quemaduras cutáneas, siendo muy parciales los datos aportados. Pero, además, en nuestro conocimiento, hasta la fecha, no se ha realizado una cuantificación sistemática de las células inmunocompetentes, de los macrófagos y de las células cebadas, ni de los capilares sanguíneos y linfáticos, en los bordes de la piel obtenida en la extirpación de la úlcera cutánea por quemaduras.

En la presente tesis se ha diseñado un nuevo método histométrico para valorar las diferencias cuantitativas de células inflamatorias y de los vasos sanguíneos y linfáticos del borde cutáneo a medida que nos alejamos del foco ulcerado; de este modo, se pretende establecer gradientes de intensidad de la respuesta inflamatoria y de la microvasculatura sanguínea y linfática en la piel quemada.

Los datos de este estudio, que son originales en cuanto a la evaluación de las úlceras cutáneas por quemaduras, podrían tener una aplicación práctica en el tratamiento de los desbridamientos progresivos de la piel que rodea a las úlceras por quemaduras. Los resultados cuantitativos, obtenidos en la presente investigación centrada en la respuesta de

células inmunocompetentes y de los capilares sanguíneos y linfáticos en tejido cutáneo periulceroso, podrían tenerse en consideración, con el fin de establecer nuevos criterios clínicos que en el futuro podrían aplicarse a la realización de injertos o colgajos cutáneos más precisos, que minimicen la necrosis y que pudieran ser más viables en la reparación quirúrgica de las úlceras cutáneas por quemaduras.

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



**HIPÓTESIS**

En las quemaduras cutáneas ¿existe un gradiente de la distribución de células inflamatorias y de la microvasculatura desde el foco ulceroso hacia la periferia de la biopsia extirpada?

**OBJETIVOS**

**PRIMERO.** Cuantificación de los linfocitos T, linfocitos B, macrófagos y células cebadas en las diferentes regiones de la piel que rodea a la úlcera cutánea por quemadura.

**SEGUNDO.** Cuantificación de los microvasos sanguíneos y linfáticos en las diferentes regiones de la piel que rodea a la úlcera cutánea por quemadura.

## MATERIAL Y MÉTODOS

## MATERIAL

En este estudio se ha evaluado, la expresión inmunohistoquímica, la cuantificación morfométrica y la distribución de los macrófagos CD68+, linfocitos T CD3+, linfocitos B CD20+, y células cebadas triptasa+; así como la distribución de los vasos sanguíneos CD31+ y de los capilares linfáticos D2-40+ en biopsias cutáneas extirpadas en pacientes con quemaduras graves. Para ello, se han utilizado tejidos histológicos, previamente fijados en formol e incluidos en parafina, procedentes del archivo de la Unidad de Investigación creada en la década de 1980 por las colaboraciones de Histología de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM) con la Unidad de Quemados del Hospital Universitario La Paz. En total, en el presente trabajo se evaluaron 47 biopsias que se distribuyeron en los siguientes grupos:

- **Grupo de Estudio:** 37 biopsias de piel de pacientes quemados.
- **Grupo Control:** 10 biopsias de piel de pacientes no quemados, obtenida de los bordes de márgenes quirúrgicos normales, procedentes de extirpaciones de otras patologías cutáneas.

## MÉTODOS

### ***Método de Estudio Histológico General***

Las biopsias cutáneas se fijaron mediante inmersión en formol neutro tamponado al 4%, durante 24-72 horas. Las muestras fueron talladas en cortes longitudinales y divididas en, al menos, tres segmentos de aproximadamente 2 mm de espesor. Estos tejidos se procesaron para estudio histológico, usando un procesador de tejidos marca Autotechnicon Duo®, lo que permitió realizar la deshidratación de las secciones, previamente fijadas, mediante pases consecutivos en alcoholes de concentraciones crecientes (70%, 96% y alcohol absoluto) y aclarado posterior en acetato de butilo (dos pases de una hora cada uno). Finalmente, las secciones tisulares se incluyeron en parafina líquida (punto de fusión 60 °C) durante dos horas.

Una vez realizados los bloques de parafina, se obtuvieron 5 cortes seriados de 5 µm de espesor de cada muestra cutánea, utilizando un micrótopo de la marca Ernst Leitz GMBH (Typ 1212) Wetzlar Germany®. Las secciones se desparafinaron en xilol, se hidrataron en

alcoholes de concentraciones decrecientes y se tiñeron con Hematoxilina-Eosina (HE) y, en ocasiones, con el método Tricrómico de Masson, siguiendo los métodos histológicos habituales. Como método de montaje para todas las técnicas histológicas se utilizó la resina sintética DePex (Probus, Badalona).

### ***Método Inmunohistoquímico de Estreptavidina-Biotina-Peroxidasa (SBP)***

Para la identificación y valoración de linfocitos, macrófagos, células cebadas y vasos sanguíneos y linfáticos, los anticuerpos explorados y la dilución óptima que se ha usado se incluyen en la Tabla 1.

Tabla 1: Anticuerpos utilizados		
Anticuerpo	Casa	Dilución
Anti-CD3, para Linfocitos T	Dako	1:25
Anti-CD20, para Linfocitos B	Dako	1:200
Anti-CD68, para Macrófagos	Dako	1:100
Anti-Triptasa, para c. Cebadas	Dako	1:200
Anti-CD31, vasos sanguíneos	Dako	1:20
Anti-D2-40, vasos linfáticos	Dako	1:50

Para realizar el método inmunohistoquímico de SBP de detección de la expresión de los seis anticuerpos se obtuvieron cortes de 5 µm de grosor del material incluido en parafina, los cuales se colocaron en portaobjetos tratados previamente con L-polylysina (Sigma, St Louis) o con xilano (Sigma, St Louis) durante 2 horas, con el fin de adherir mejor el corte histológico al portaobjetos.

Las secciones se procesaron con el método de Estreptavidina-Biotina-Peroxidasa (Complejo SBP), siguiendo el método general inmunohistoquímico, descrito por Hsu, con las modificaciones habituales de nuestro laboratorio,<sup>112,139</sup> las cuales se especifican a continuación: las secciones histológicas fueron desparafinadas, se hidrataron en alcoholes decrecientes, hasta el agua destilada. A continuación, se procedió a la inhibición de la peroxidasa endógena de los tejidos mediante inmersión en peróxido de hidrógeno al 3%, a

temperatura ambiente, durante diez minutos. Los cortes se lavaron en buffer fosfato (PBS), a temperatura ambiente, pH 7,4, durante 5 minutos. Se procedió al desenmascaramiento del epítipo mediante tratamiento por calor; para ello, las preparaciones se introdujeron en buffer citrato a pH 7,6 y se realizó el tratamiento con microondas en dos pases de 2,5 minutos, procurando que las preparaciones no llegasen a hervir, y enfriando las mismas entre cada uno de los pases. Posteriormente, las preparaciones se dejaron reposar durante 20 minutos a temperatura ambiente, para luego realizar un lavado rápido, de dos minutos, en H<sub>2</sub>O destilada, con el fin de retirar el sobrenadante del buffer citrato. Las preparaciones se lavaron en buffer PBS, pH 7,4, dos pases, cada uno de 5 minutos. Seguidamente, se realizó el bloqueo de las inmunoglobulinas inespecíficas de los tejidos, aplicando suero bovino normal, durante 20 minutos y a temperatura ambiente. Se extrajo por decantación el sobrenadante del suero bovino, sin lavar nunca entre este paso y el siguiente.

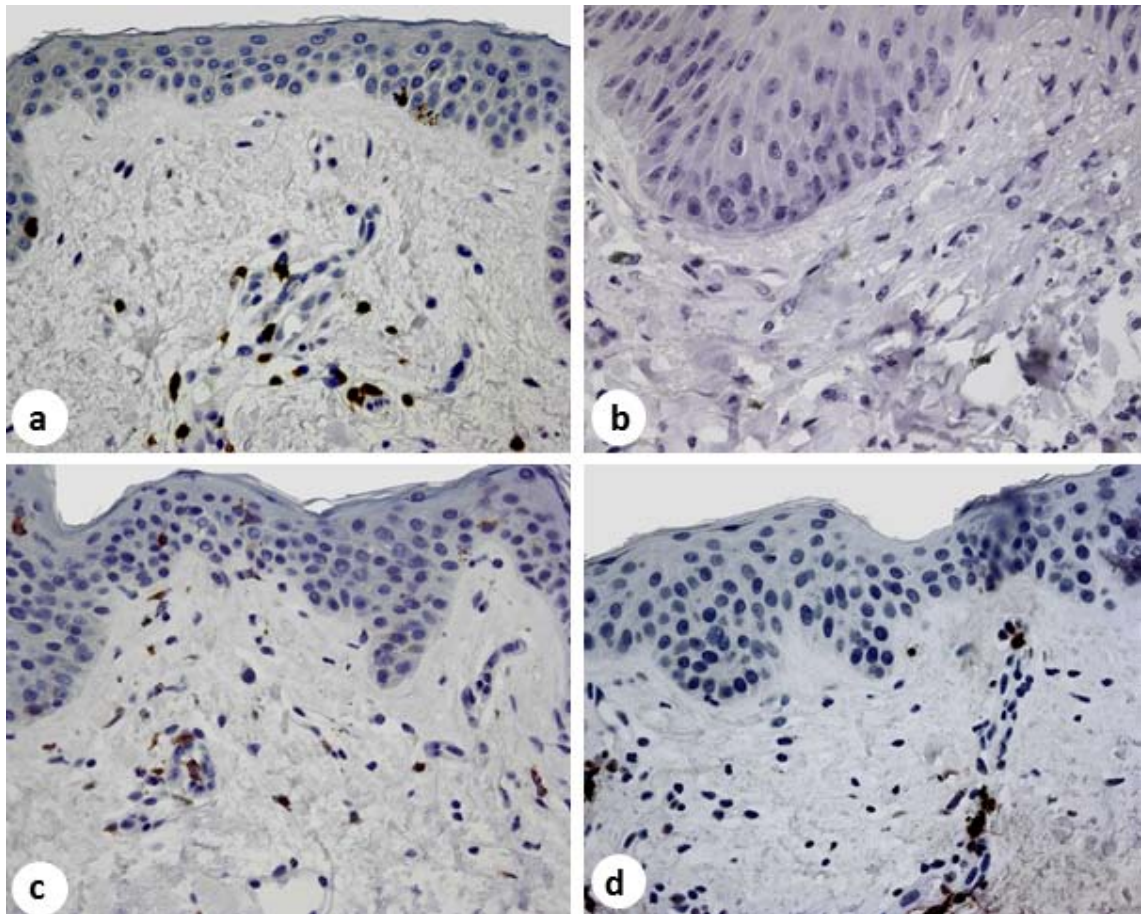
A continuación, se cubrió cada preparación con el anticuerpo primario, a la dilución óptima (Tabla1) en una solución de PBS+BSA al 1%. El anticuerpo primario se incubó durante toda la noche a 4° C en cámara húmeda. Las secciones se lavaron en tres pases de PBS, de 5 minutos cada uno, a temperatura ambiente. Se añadió a las secciones el complejo biotinilado anti-ratón, con una dilución 1:200, durante 20 minutos y a temperatura ambiente. Después, se lavaron las preparaciones en tres pases de PBS, durante 5 minutos cada pase y a temperatura ambiente. Las preparaciones se incubaron en el complejo Estreptavidina-Biotina-Peroxidasa (SBP) (Zymet, San Francisco, USA), durante 30 minutos y a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados en PBS durante 5 minutos.

La inmunorreacción se reveló con diaminobencidina (Sigma, St. Louis, USA) (30 mg de diaminobencidina en 10 ml de buffer tris-HCl, a pH 7,4 y con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,015 %). El tiempo de revelado con diaminobencidina fue de 3 minutos. A continuación, se hizo una tinción nuclear con hematoxilina de Harris. Las preparaciones se lavaron con abundante agua destilada, se deshidrataron en etanol en concentraciones crecientes, y se montaron en la resina sintética DePex.

Todas las muestras histológicas fueron fotografiadas por campos con un fotomicroscopio Leica Eclipse 55i equipado con una cámara digital Leica DC200 y adquiridas

con el software Image-Pro Plus y procesadas en formato TIFF. Todas las fotografías fueron realizadas con el objetivo de 40x.

En la figura 1 se documenta la optimización de los métodos de inmunohistoquímica efectuados en nuestro laboratorio para la identificación de linfocitos T CD3+, Linfocitos B CD20+, macrófagos CD68+ y células cebadas triptasa+.

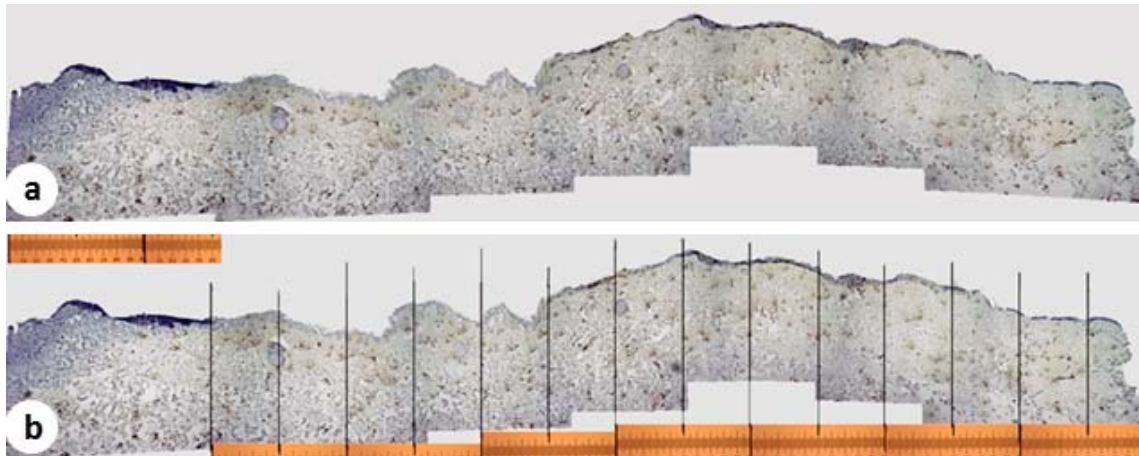


**Figura 1.** **a:** Identificación de Linfocitos T en biopsia cutánea, mediante el anticuerpo anti-CD3. **b:** Identificación de Linfocitos B en biopsia cutánea, mediante el anticuerpo anti-CD20. **c:** Identificación de macrófagos en biopsia cutánea, mediante el anticuerpo anti-CD68. **d:** Identificación de células cebadas en biopsia cutánea, mediante el anticuerpo anti-Triptasa.

### ***Método de Cuantificación de células Inmunocompetentes***

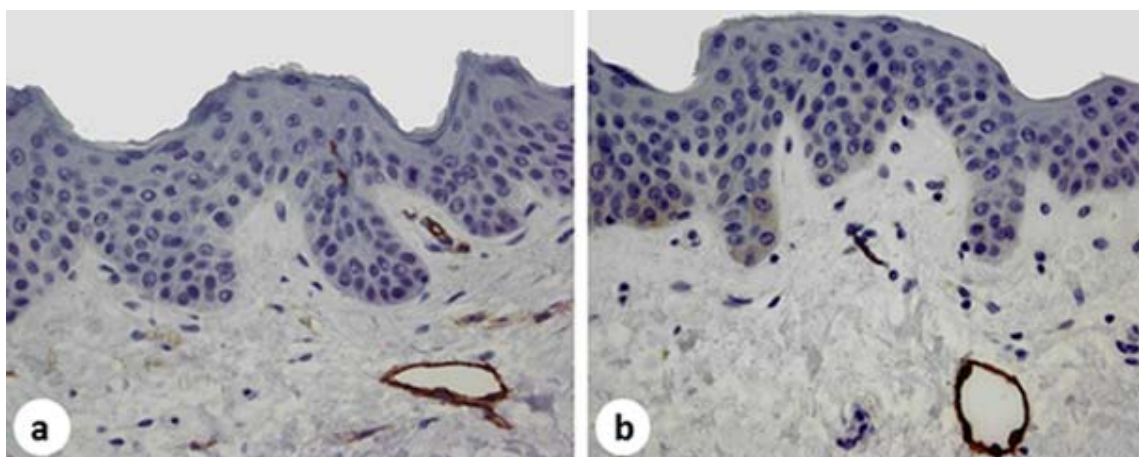
En cada campo, se contaron el número de macrófagos CD68+, el número de células cebadas Triptasa+, el número de linfocitos CD3+ y el número de linfocitos CD20+ localizados en la dermis (Fig. 1). El proceso de selección de campos microscópicos, con el fin de efectuar

después las cuantificaciones histométricas, se describe brevemente a continuación: en cada muestra se fotografiaron, con el objetivo 40x, 11 campos correlativos, cada uno de 500  $\mu\text{m}$  de longitud, numerándose consecutivamente, desde el límite de la úlcera (segmento 1) hasta las zonas más periféricas de la biopsia cutánea (segmento 11) (Fig. 2); en algunos casos coincidía con el borde de extirpación quirúrgica.



**Figura 2.** Composición infográfica de los 11 campos microscópicos fotografiados consecutivamente en los que se han realizado los estudios histométricos. (Las imágenes de un caso fueron tomadas usando el anticuerpo anti-CD68).

En el presente estudio también se identificaron los capilares y vénulas sanguíneas de la dermis mediante el anticuerpo anti-CD31, y los capilares y hendiduras linfáticas usando el anticuerpo anti-D2-40.



**Figura 3. a:** Identificación de vasos sanguíneos en biopsia cutánea, mediante el anticuerpo anti-CD31. **b:** Identificación de vasos linfáticos en biopsia cutánea, mediante el anticuerpo anti-D2-40.

Para la cuantificación de la distribución de los vasos CD31+ y D2-40+ de la dermis, fue conveniente distribuir la biopsia cutánea solo en seis regiones (agrupando de dos en dos las regiones que se cuantificaron de células inmunocompetentes), y cada una de 1.000  $\mu\text{m}$  de longitud, considerando la Región 1 para el borde periulceroso y la Región 6 la zona más periférica; siendo en definitiva la misma superficie medida en cada caso (ver Fig. 2). Para la cuantificación de la superficie ocupada por los microvasos, con respecto a las áreas de la dermis, se usó el programa Imagen J, y los datos en cada región fueron expresados como la relación entre el área ocupada por los microvasos capilares sanguíneos y linfáticos, por 100.000  $\mu^2$ , de superficie de dermis, en cada una de las regiones de 1.000  $\mu$  lineales de la dermis.

### Software Imagen J

Las imágenes de vasos sanguíneos y de vasos linfáticos se procesaron con el software Imagen J (<http://rsb.info.nih.gov/ij>), el cual es ampliamente utilizado en numerosos estudios histométricos. Brevemente, describimos el software y el procesamiento y análisis de las imágenes que incluyó el denominado *Colour deconvolution*, la Segmentación y, por último, la Cuantificación.

Image J es un programa de procesamiento de imagen digital de dominio público, programado en Java y desarrollado en el National Institutes of Health. La primera versión del programa fue desarrollada por Wayne Rastban en 1997. Las características actuales del programa consisten en numerosas plugins y macros (macroinstrucciones) para el procesamiento de imágenes y operaciones de análisis, incluyendo segmentación y extracción de la imagen, reducción del ruido, transformaciones de la imagen y análisis de partículas. Estas características han sido expandidas por una amplia base de usuarios activos. Actualmente existen cientos de plugins y macros disponibles para su descarga. Otras ventajas del programa incluyen la capacidad de soportar numerosos tipos de formatos independientes de la plataforma. Como resultado de su independencia del tipo de plataforma, Imagen J es capaz de funcionar en múltiples sistemas operativos, incluyendo MS Windows, Apple OS y Linux.



Colour deconvolution. El *plugin color*, desarrollado por Gabriel Landini, Colour deconvolution (pluginv1.5.[<http://www.dentistry.bham.ac.uk/landinig/software/cdeconv/cdeconv.html>]), fue usado para separar imágenes originales en tres imágenes que contienen los componentes del método inmunohistoquímico de Estreptavidina-Biotina-Perodxidasa (SBP) usando el vector H-DAB. El *plugin* crea una imagen adicional correspondiente al revelado con DAB de color marrón. Debido a que las regiones de interés son aquellas que expresan una tinción de color marrón, solo la imagen de 8-bit DAB fue conservada.

Segmentación de imagen. La herramienta *threshhold* (umbral) fue utilizada para separar los pixeles más oscuros que el valor de *threshhold*. Mediante esta selección podemos seleccionar aquellas regiones que presentan inmunotinción de aquellas con inmunotinción negativa y proceder a su cuantificación.

Cuantificación. En cada imagen, después de aplicar el *plugin colour deconvolution* y seleccionar el valor umbral, se procedió a cuantificar el área correspondiente a la superficie total del intersticio testicular y del área tubular, y la superficie correspondiente a aquellas áreas que expresaron inmunotinción. El resultado se expresó como un ratio entre el área inmunomarcada y el área total de vasos sanguíneos y linfáticos, respecto del área total de la dermis.

### ***Método Estadístico***

Para informatizar los datos de los resultados, se creó una base de datos (BD) con el programa Excel y se procesaron con la estructura adecuada para poder analizarlos posteriormente.

Se usó un análisis de varianza de una vía (ANOVA *one-way*) en el análisis estadístico de los biomarcadores en diferentes regiones. En el caso de existir diferencia estadística, la prueba de Tukey se usó para comparar los promedios.

Para los modelos espaciales, es decir aquellos que describen como cambian los biomarcadores con la región del tejido, se empleó el análisis de regresión lineal simple. El

coeficiente de determinación ( $R^2$ ) se usó como indicador de ajuste de los modelos espaciales.

El grado de asociación entre los biomarcadores en las diferentes regiones del tejido se valoró mediante análisis de correlación de Pearson. Los valores de  $p < 0.05$  revelaron una asociación estadísticamente significativa. Los valores del coeficiente de correlación ( $r$ ) positivos revelan una asociación directa y los negativos una relación inversa entre los biomarcadores.

Para el análisis estadístico se usó el programa Prism GraphPad (GraphPad Software Inc., USA).

### ***Técnicas Fotográficas***

Las imágenes microscópicas han sido capturadas con una cámara digital Leica DC200, almacenadas en formato TIFF y tratadas con el programa Adobe Photoshop 5.0. La composición de las planchas iconográficas se ha realizado con el programa Quark X Press 4.0.

## RESULTADOS

## **ESTUDIO DE LA INFILTRACIÓN DE LINFOCITOS T CD3+, MACRÓFAGOS CD68+ Y CÉLULAS CEBADAS TRIPTASA+ EN EL BORDE DE LA ÚLCERA CUTÁNEA POR QUEMADURA**

La presente Tesis está centrada en el estudio histopatológico de las fases iniciales del desarrollo de la respuesta de células inmunocompetentes y de angiogénesis de la piel afectada por una quemadura grave. Es evidente que la respuesta inmunológica es diferente en la porción central de la quemadura, en donde se produce una ulceración y necrosis completa de la lesión, que en los bordes de piel que rodean a la ulceración. Sin embargo, en nuestro conocimiento no existen estudios sistematizados histométricos que cuantifiquen los diferentes tipos de células inmunocompetentes y la proliferación de capilares sanguíneos y linfáticos en el centro de las lesiones por quemadura y en los bordes de escisión quirúrgica, aparentemente con conservación de la piel normal.

En el centro de la úlcera cutánea por quemadura se evidencia una destrucción completa de la epidermis y dermis subyacente, existiendo un foco necrótico, rodeado, en las primeras fases de la quemadura, por una respuesta inflamatoria aguda, con migración de abundantes leucocitos neutrófilos. Dentro de este foco inflamatorio necrótico predominan la presencia de detritus celulares y de numerosas bacterias, asimismo se pueden ver una variable cantidad de leucocitos polimorfonucleares y de macrófagos CD68+. Además, acompañando a esta respuesta inmunológica inespecífica en la fase aguda, se desarrolla también una respuesta de células inmunocompetentes, fundamentalmente linfocitos y células plasmáticas, que se disponen alrededor de la úlcera cutánea. Los métodos inmunohistoquímicos usados en nuestro estudio permiten identificar abundantes linfocitos T CD3+, que se disponen en la dermis de la zona periulcerosa; sin embargo, son muy escasos y generalmente están ausentes los infiltrados de linfocitos B CD20+.

En los bordes de la epidermis adyacente a la úlcera, se observan queratinocitos que muestran lesiones de necrosis coagulativa, siendo evidente la dehiscencia de estas células, debido a la rotura de los puentes intracelulares; se forma así un estadio inicial del desarrollo de múltiples microvesículas epidérmicas, que pueden coalescer próximas entre sí para formar vacuolas intraepidérmicas de mayores dimensiones y que contienen detritus celulares neutrófilos, linfocitos T CD3+, macrófagos CD68+ y células cebadas. Además,

frecuentemente la limitante dermo-epidérmica de estas áreas periulcerosas puede sufrir degeneración parcial e incluso completa destrucción por el efecto térmico de la quemadura; por ello, en muchos casos, se ven también vesículas dermo-epidérmicas, con destrucción de la membrana basal y necrosis coagulativa del tejido conjuntivo de la dermis papilar. Estos cambios se asocian a la presencia de amplios infiltrados inflamatorios, constituidos por leucocitos neutrófilos, pero también por abundantes Linfocitos T CD3+ y por macrófagos CD68+. En aquellos casos que presentan múltiples vesículas alejadas del foco ulceroso necrótico principal frecuentemente se evidencia la diapédesis de linfocitos y macrófagos, los cuales migran a través de la membrana basal y producen su destrucción; contribuyendo a la formación de vesículas dermo-epidérmicas.

La dermis papilar de las áreas que rodean el foco ulceroso principal presenta un intenso edema con aumento de la matriz extracelular y rarefacción de las fibras de colágeno. Estos cambios degenerativos del tejido conjuntivo se asocian a la presencia de vasodilatación de los capilares de la dermis papilar. Además, es muy frecuente observar la migración de leucocitos polimorfonucleares y también de linfocitos a través de la pared de los microvasos de la dermis papilar y reticular.

Uno de los objetivos fundamentales de la presente Tesis es determinar cómo cambia la respuesta inflamatoria a medida que nos vamos alejando del foco ulceroso necrótico y principal hasta alcanzar el borde más periférico correspondiente a la incisión quirúrgica. Para ello, hemos establecido 11 segmentos de tejido periulceroso desde el nivel 1 inmediatamente en la vecindad del borde de la úlcera, hasta el nivel 11 más periférico, que a veces coincide con el borde quirúrgico de la biopsia.

Desde el punto de vista histológico, llama la atención una mayor concentración de linfocitos T y de macrófagos, así como de células cebadas, en los segmentos medios de la piel periulcerosa que en los segmentos periféricos, tanto a nivel de la dermis papilar, como en la reticular. Sin embargo, en el caso particular de las células cebadas, el comportamiento de su distribución en el tejido cutáneo quemado no está tan segmentado, dado que las células cebadas se distribuyen al azar por todo el tejido conjuntivo de la dermis.

El estudio histológico de la distribución de los linfocitos T CD3+, así como su documentación iconográfica, están incluidos entre las paginas 42-43; así mismo, la cuantificación histométrica de los linfocitos T CD3+ y su tendencia de distribución en las 11 regiones que se han considerado en la piel que rodea a la úlcera por quemadura viene reflejado en la página 44.

Respecto a los estudios cuantitativos de los linfocitos B CD20+, se han incluido los datos en la página 45; también se ha constatado la tendencia de su distribución en las 11 regiones del borde periulceroso de la biopsia cutánea, lo que se representa en la página 46.

Así mismo, los macrófagos CD68+ se han cuantificado en el tejido periulceroso, fotografiándose tanto las áreas próximas a la úlcera postquemadura, como las zonas centrales y periféricas de la biopsia cutánea (páginas 47-48). La tendencia de distribución en las 11 regiones se incluye también en la página 49.

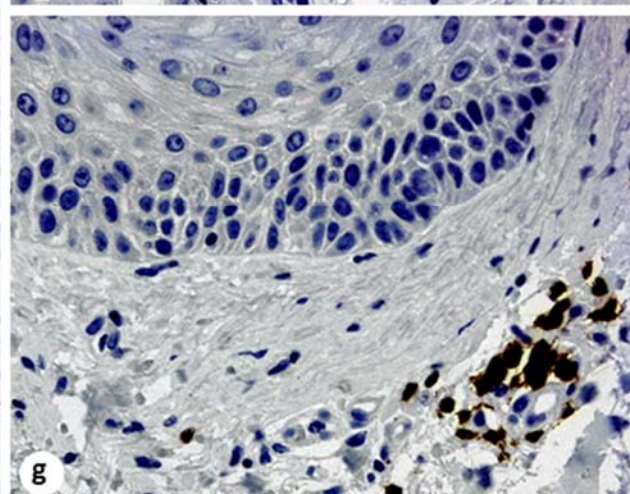
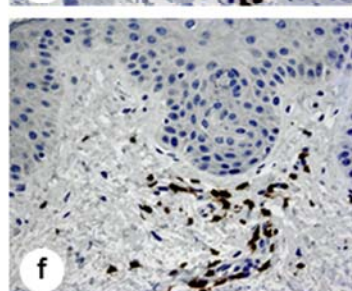
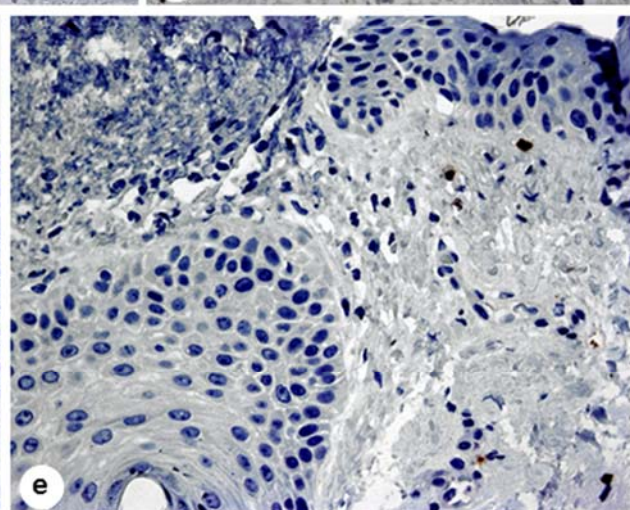
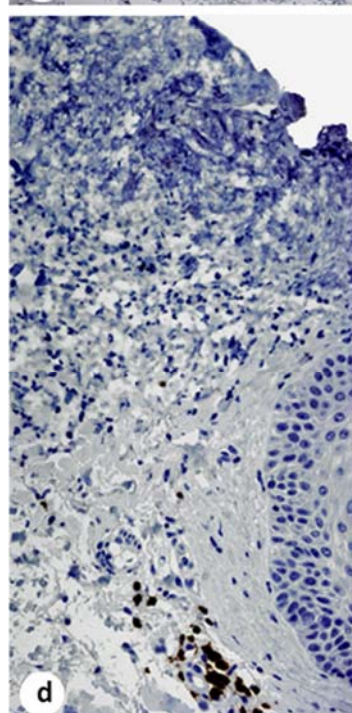
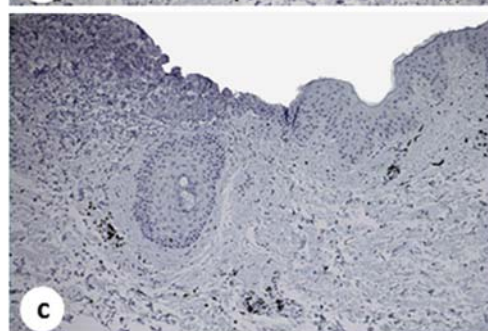
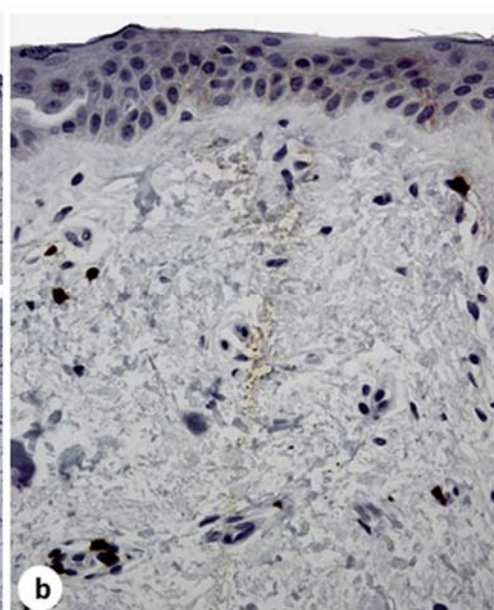
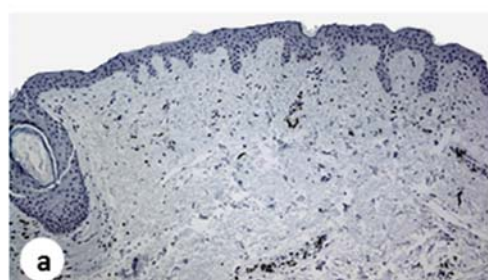
Por último, las peculiaridades morfológicas de las células cebadas Triptasa+, así como los datos morfométricos de su distribución pueden estudiarse en las páginas 50-51. La tendencia de distribución desde el centro de la úlcera hasta la periferia del borde quirúrgico (esto es, de las 11 regiones de la biopsia cutánea), está documentada en la página 52.

En cada una de las 11 regiones en las que se ha dividido la biopsia cutánea, se ha realizado una investigación de la posible correlación estadística entre cada uno de los tipos celulares evaluados en el presente estudio; para ello, se ha mostrado en cada gráfica de la recta de regresión el valor de  $r$  y su significación estadística, considerando estadísticamente significativo  $p < 0.005$ . Los datos y gráficos de cada una de las 11 regiones están incluidos entre las páginas 53 y 63. En la mayoría de las regiones, se han obtenido correlaciones fuertemente significativas cuando se comparan cada uno de los tipos de células inmunocompetentes y también cuando se comparan los linfocitos T y los macrófagos con las células cebadas.

### ***Estudio de la Infiltración de Linfocitos T CD3+ en el Borde de la Úlcera Cutánea por Quemadura***

***Figura 4. Evaluación de los Linfocitos T CD3+ en la Úlcera Cutánea Postquemadura***

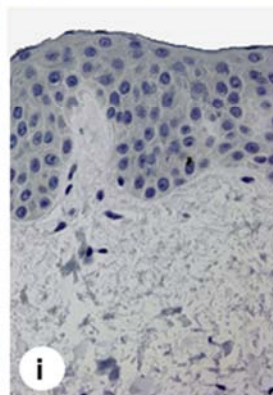
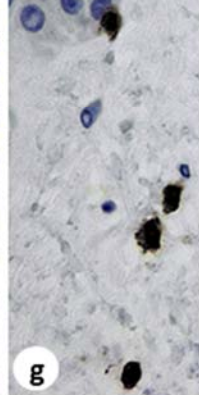
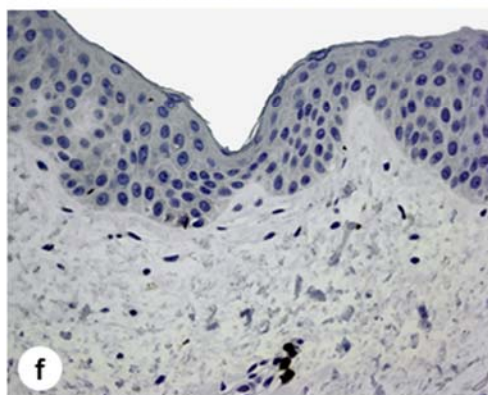
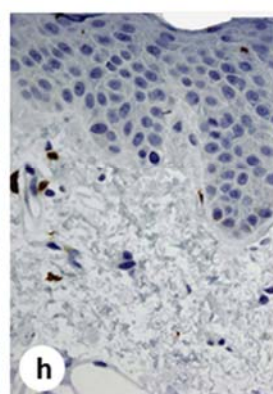
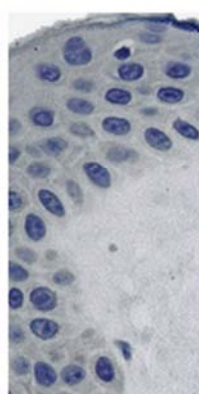
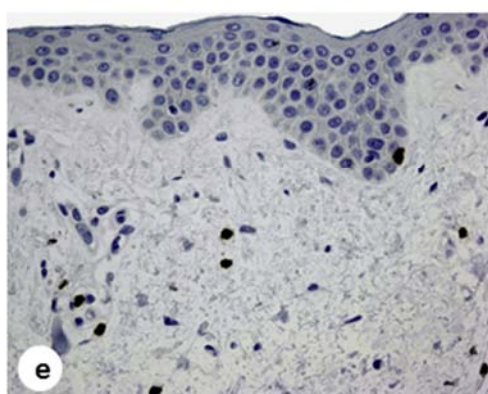
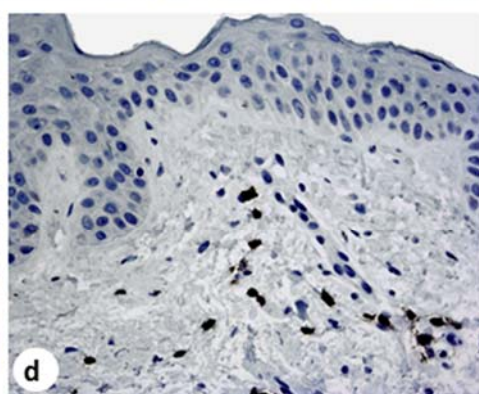
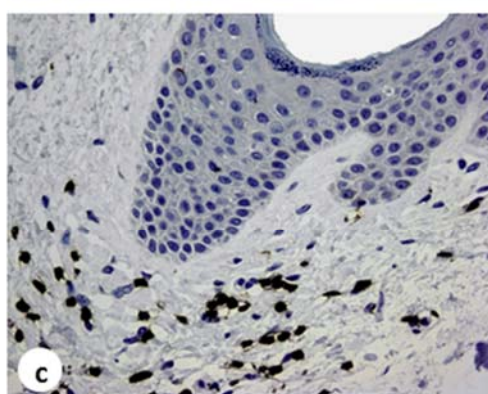
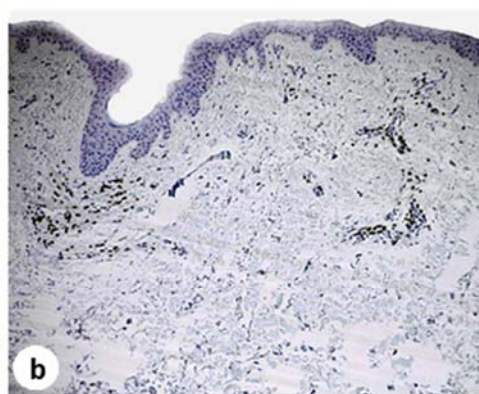
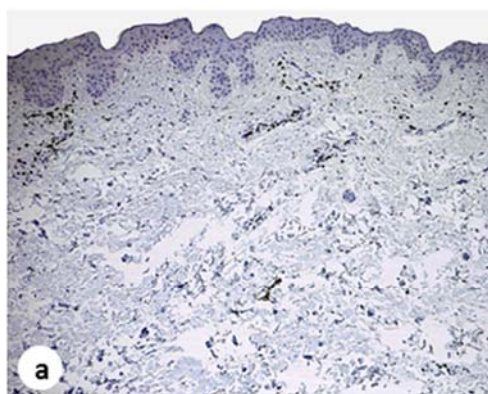
- a. Estructura de piel normal en la que se observan escasos linfocitos perivasculares.
- b. Detalle de la imagen anterior que muestra linfocitos CD3+ alrededor de la adventicia de algunos capilares. También se observan linfocitos migrando en la dermis papilar.
- c. Imagen panorámica de una úlcera cutánea profunda. Se observa tejido necrótico, rodeado por tejido conjuntivo dérmico con inflamación aguda y crónica en el que se identifican linfocitos CD3+.
- d. Detalle de la imagen anterior. El tejido necrótico contiene sólo detritus celulares y leucocitos polimorfonucleares. En la periferia de un folículo piloso se ven pequeños acúmulos de linfocitos CD3+.
- e. En otro detalle de la figura anterior se aprecia mejor la disrupción de la membrana basal de la epidermis y la presencia de linfocitos CD3+ infiltrando aisladamente en la dermis adyacente.
- f. Alejándonos de la úlcera se observan mayores acúmulos de linfocitos CD3+, los cuales se disponen tanto en el intersticio del tejido conjuntivo como alrededor de los vasos sanguíneos.
- g. Zona superficial en la vecindad del borde ulceroso, en la que los linfocitos CD3+ forman pequeños nidos sólidos.





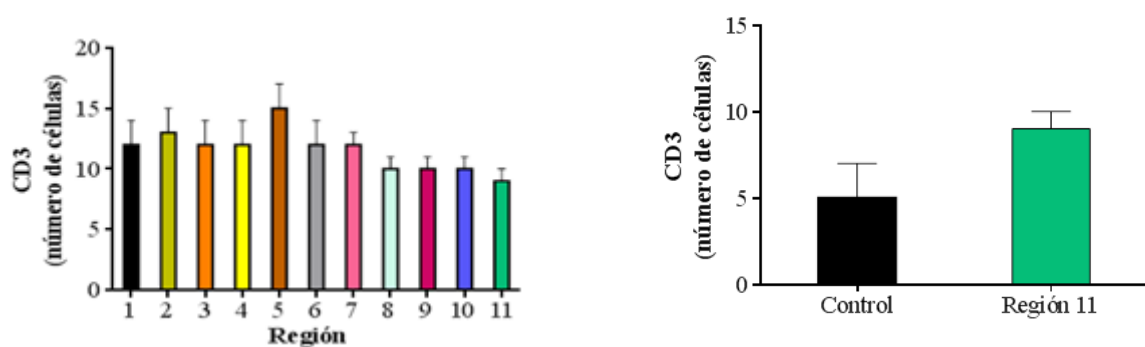
***Figura 5. Evaluación de los Linfocitos CD3+ en la Zona Media y Distal de la Piel Quemada***

- a. Superficie media del borde quirúrgico donde se observan múltiples acúmulos nodulares de linfocitos CD3+ infiltrando la dermis papilar y la dermis reticular.
- b. Otra área de la región media, en la que los linfocitos CD3+ se disponen en acúmulos, tanto en la dermis papilar como en la porción superficial de la dermis reticular.
- c. Detalle de la porción media del borde periulceroso con abundante infiltración difusa de linfocitos CD3+ que disgregan la matriz extracelular y las fibras de colágeno de la dermis superficial.
- d. Los linfocitos CD3+ se distribuyen aisladamente entre las fibras de colágeno, provocando pequeña degeneración de la matriz extracelular.
- e. Zona más externa correspondiente al borde quirúrgico de la úlcera cutánea. Se observan escasos linfocitos CD3+ en la dermis reticular que se disponen aisladamente; además, se evidencia un linfocito CD3+ que migra a través del estrato basal de la epidermis.
- f. En la zona del borde quirúrgico, es excepcional ver pequeños acúmulos de linfocitos CD3+.
- g. Detalle a gran aumento del borde de escisión quirúrgica en el que se pueden apreciar escasos linfocitos CD3+ intensamente teñidos en el citoplasma de la dermis superficial y la presencia de un linfocito que migra atravesando la limitante dermo-epidérmica y destruyendo la membrana basal.
- h, i. Los linfocitos CD3+ son muy escasos y siempre se disponen aisladamente y no se observa ningún linfocito CD3+ en la zona más periférica de la escisión quirúrgica.



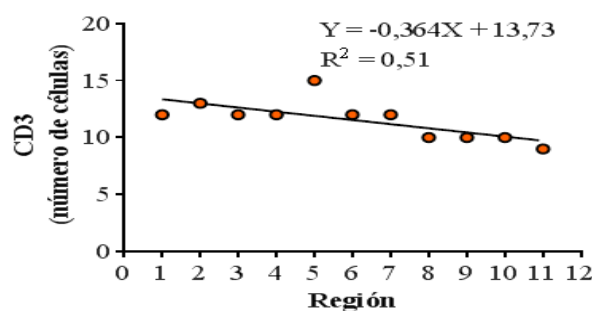
### ***Distribución del Número de Linfocitos T CD3+ en la Dermis, en Relación a la Distancia del Borde de la Úlcera***

El estudio cuantitativo de los linfocitos T CD3+ ha demostrado un significativo incremento con respecto al grupo control ( $p < 0.05$ ). Cuando consideramos esta cuantificación de linfocitos CD3+ en cada una de las 11 regiones que hemos evaluado en la piel quemada, observamos que el número de células es variable, aunque no se detectan diferencias estadísticamente significativas cuando se compara cada región con las adyacentes.



**Figuras 6 y 7.** Distribución del número de Linfocitos T CD3+ en las diferentes regiones de la dermis, a medida que se alejan del borde ulceroso. 1: borde de úlcera, 11: región de la dermis situada a 5.500 micras del borde ulceroso. No hay diferencias estadísticas entre cada región. Si existen diferencias significativas con respecto al Grupo Control de piel normal ( $p < 0.005$ ).

La distribución del número de linfocitos T CD3+ presenta un modelo de tendencia significativamente decreciente a medida que nos alejamos del foco ulceroso principal.



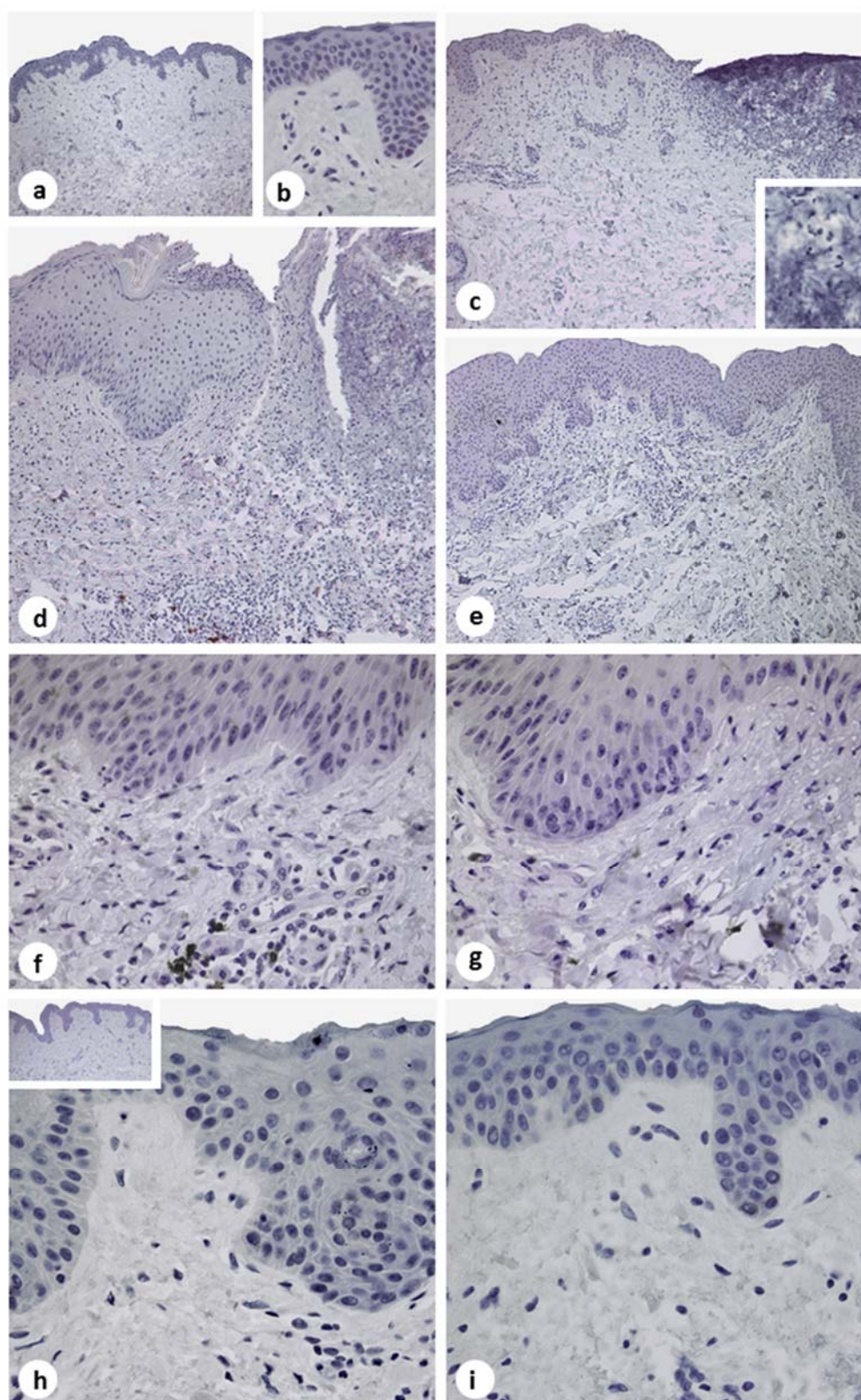
**Figura 8.** Tendencia de la distribución de linfocitos T CD3+ en las diferentes regiones de la dermis a medida que se alejan del borde ulceroso. El valor de R da una significación estadística de  $p < 0.005$ .

### ***Estudio de la Infiltración de Linfocitos B CD20+ en el Borde de la Úlcera Cutánea por Quemadura***

***Figura 9. Evaluación de los Linfocitos B CD20+ en la Úlcera y en la Zona Media y Distal de la Piel Quemada***

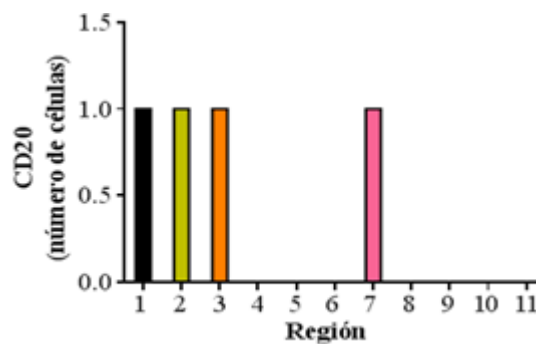
- a. Biopsia normal del grupo control con ausencia de linfocitos CD20+.
- b. Detalle de otro caso control en que no se evidencia la infiltración de linfocitos B.
- c. Úlcera cutánea de gran extensión con abundante necrosis coagulativa e importantes infiltrados inflamatorios en el borde de la úlcera. **Inset:** se observa a gran aumento la presencia de numerosas bacterias y detritus celulares en el foco necrótico.
- d. Imagen panorámica del borde de la úlcera. Son muy evidentes los infiltrados de leucocitos polimorfonucleares y de otras células inmunocompetentes. Los linfocitos CD20+ son muy escasos y solo se ve un pequeño grupo en la porción más inferior de la imagen.
- e. Imagen panorámica del borde quirúrgico periulceroso. Persisten los infiltrados inflamatorios de la dermis y la migración de linfocitos hacia la epidermis; sin embargo, en la imagen no se reconocen linfocitos CD20+ o son muy escasos.
- f. Región media de la piel del borde periulceroso. Se ven pequeños infiltrados de células inmunocompetentes y la mayoría son inmunohistoquímicamente negativas, aunque también se ven pequeños nidos de linfocitos B CD20+.
- g. Zona media de la piel periulcerada que muestra pequeña degeneración del tejido conjuntivo y una evidente ausencia de los linfocitos B CD20+.
- h. Zona más externa de la úlcera cutánea correspondiente al borde quirúrgico. Epidermis y dermis son rigurosamente normales. **Inset:** se observa una imagen panorámica de este borde quirúrgico que indica que la escisión se ha realizado por un tejido sano.
- i. Detalle del borde quirúrgico con una epidermis y dermis completamente normales.





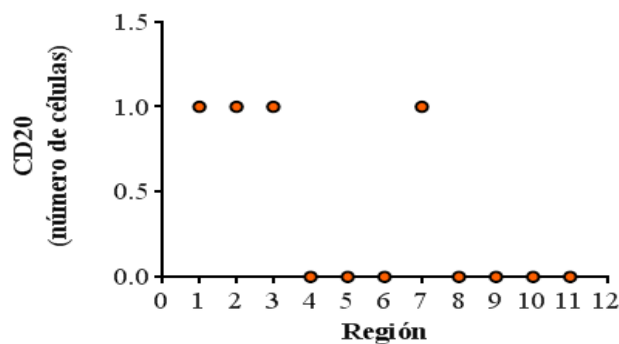
### ***Distribución del Número de Linfocitos B CD20+ en la Dermis, en Relación a la Distancia del Borde de la Úlcera***

La cuantificación de los linfocitos B CD20+ ha sido completamente irregular en las diferentes regiones estudiadas; además, numerosas regiones cutáneas peri-ulcerosas carecen de linfocitos B. Así mismo, en la piel normal los linfocitos B son extraordinariamente escasos y, por ello, no se ha realizado su cuantificación.



**Figura 10.** Distribución del número de Linfocitos B CD20+ en las diferentes regiones de la dermis a medida que se alejan del borde ulceroso. 1: borde de úlcera, 11: región de la dermis situada a 5.500 micras del borde ulceroso. No hay diferencias estadísticas entre cada región.

Esta ausencia de linfocitos B en las regiones más alejadas de la úlcera determina que no se haya podido obtener ninguna tendencia de distribución.



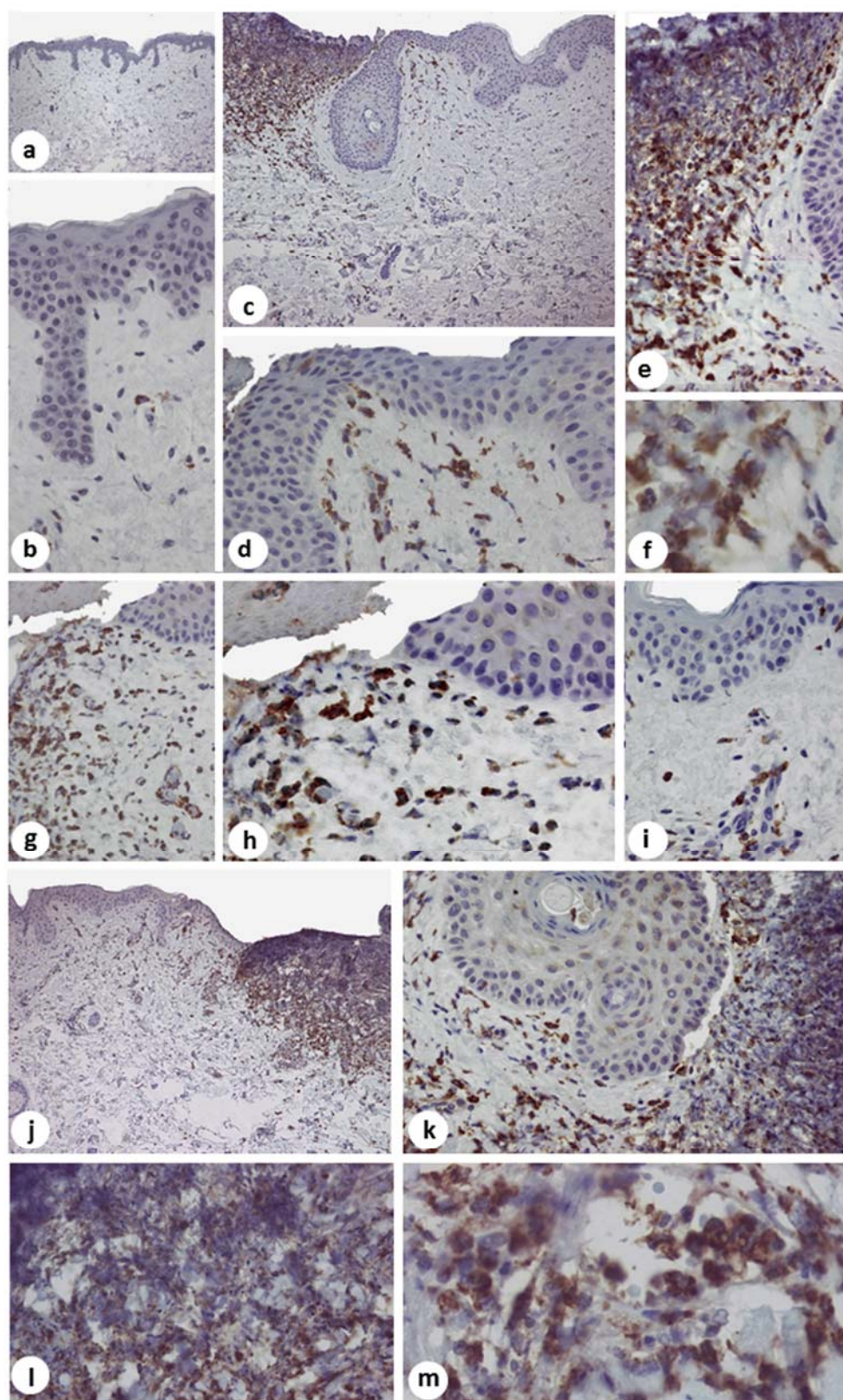
**Figura 11.** Tendencia de la distribución de Linfocitos B CD20+ en las diferentes regiones de la dermis a medida que se alejan del borde ulceroso. No se ha encontrado ninguna significación.

## ***Estudio de la Infiltración de Macrófagos CD68+ en el Borde de la Úlcera Cutánea por Quemadura***

### ***Figura 12. Evaluación de los Macrófagos CD68+ en la Úlcera Cutánea Postquemadura***

- a. Piel normal. Se ve mínima cantidad de macrófagos CD68+ localizados en la dermis.
- b. Detalle de la imagen anterior. Sólo se evidencian dos macrófagos en el tejido de la matriz extracelular. La epidermis carece de células inmunocompetentes y es normal.
- c. Úlcera cutánea con infiltrados inflamatorios alrededor del foco necrótico. Se observan macrófagos en el tejido conjuntivo que rodea a la úlcera.
- d. Detalle de la imagen anterior de la interfase de la úlcera con la epidermis y dermis adyacente. En la dermis papilar hay numerosos macrófagos y destruyen la limitante dermo-epidérmica e infiltran la capa basal de la epidermis.
- e, f. Foco necrótico con abundantes detritus celulares y bacterias en la vecindad de un folículo pilosebáceo. Se aprecian células inflamatorias y numerosos macrófagos CD68+, que contienen en el interior partículas necróticas fagocitadas.
- g. Úlcera cutánea con necrosis coagulativa de la epidermis y de la unión dérmico-epidérmica. Se ven abundantes macrófagos en el tejido conjuntivo superficial.
- h. En el detalle se ve intenso marcaje de CD68+ en el citoplasma de los macrófagos.
- i. En la vecindad de la úlcera, el tejido conjuntivo y la matriz extracelular de la dermis están edematosos, y los vasos sanguíneos presentan diapédesis de macrófagos CD68+.
- j. Otro caso con una muy extensa úlcera cutánea. Existe una masiva infiltración de leucocitos y de macrófagos, sobre todo en el fondo de la zona periulcerosa.
- k. En el detalle de la biopsia anterior, el tejido necrótico rodea un folículo piloso. También se observan numerosos macrófagos CD68+ infiltrando la membrana basal del folículo.
- l. En la masa necrótica no hay células inflamatorias, pero se ven numerosas bacterias y una inmunotinción difusa de CD68+ que pudiera corresponder a macrófagos que han sido destruidos por la progresión de la quemadura y de la infección bacteriana.
- m. El tejido conjuntivo que rodea a la úlcera presenta áreas necróticas cavitadas, en cuyo interior se encuentran numerosos macrófagos CD68+.

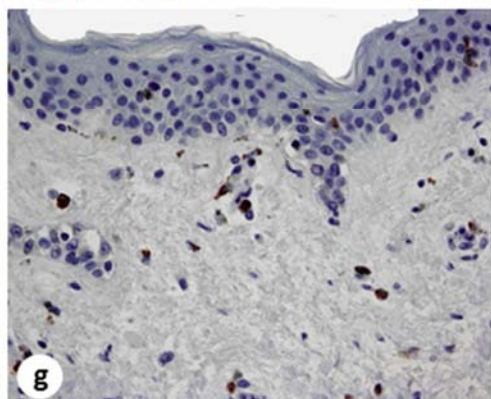
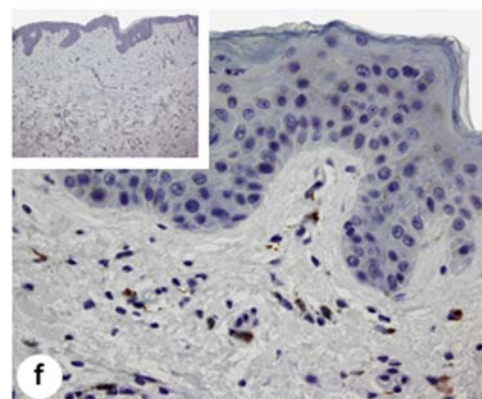
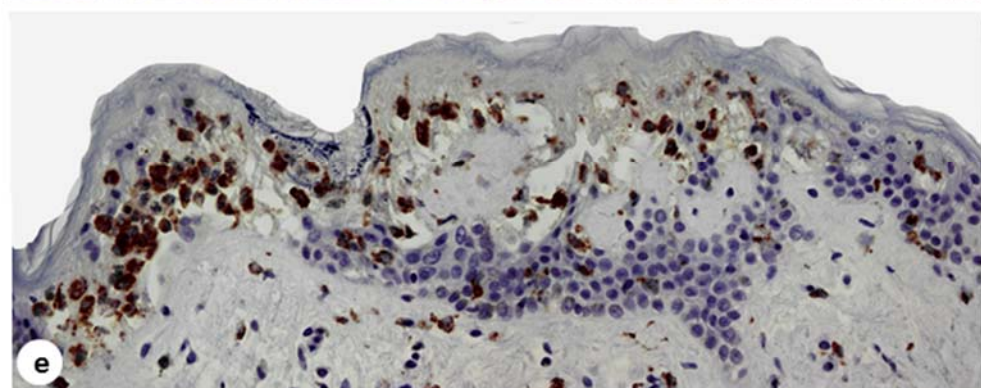
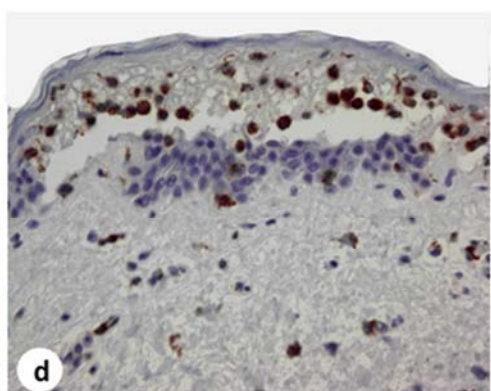
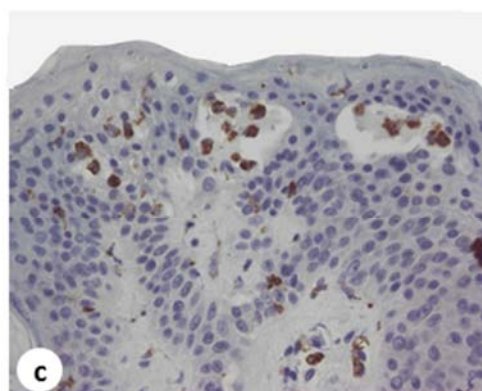
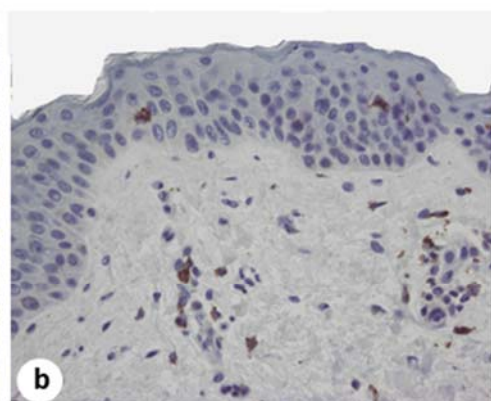
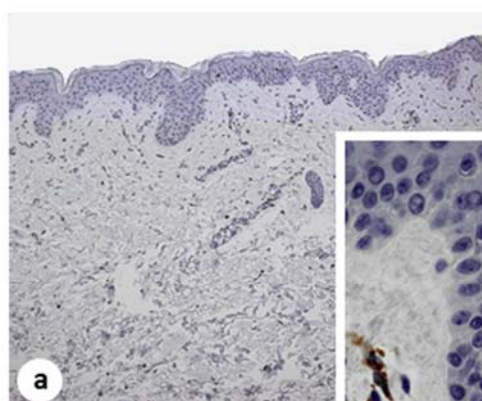






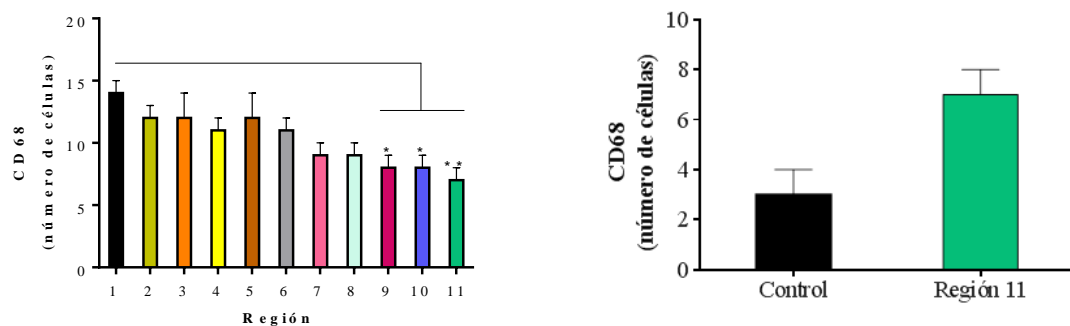
***Figura 13. Evaluación de los Macrófagos CD68+ en la Zona Media y Distal de la Piel Quemada***

- a. Imagen panorámica de la región media de la biopsia cutánea en la que se observan múltiples acúmulos de macrófagos, fundamentalmente en la dermis reticular. Algunos macrófagos se disponen en la adventicia vascular. **Inset:** detalle a gran aumento de una papila dérmica con la presencia de dos macrófagos CD68+.
- b. En la región intermedia de la piel extirpada, los macrófagos pueden invadir la limitante dermo-epidérmica, e incluso localizarse en el interior del estrato escamoso de la epidermis. Así mismo, son evidentes los macrófagos perivasculares, rodeando los capilares de las papilas dérmicas.
- c,d,e. Caso muy demostrativo que documenta la presencia de múltiples vesículas intraepidérmicas en zonas intermedias, alejadas del foco ulceroso principal. Se ve necrosis coagulativa de los queratinocitos que delimitan las múltiples vesículas y en su interior se identifican numerosos macrófagos CD68+; además, es muy evidente la migración de macrófagos a través de la limitante dermo-epidérmica destruida.
- f. Borde quirúrgico más externo de la úlcera cutánea que contiene muy escasos macrófagos, los cuales sólo se disponen aisladamente tanto en la dermis papilar como en la dermis reticular. **Inset:** imagen panorámica del borde de incisión quirúrgica en el que se demuestra que los infiltrados inflamatorios son muy escasos o están ausentes y, por tanto, la extirpación se realizó correctamente por piel sana.
- g. Otro detalle de la zona más externa de una biopsia-extirpación de la quemadura. Los macrófagos son muy escasos y se disponen dispersos en el tejido conjuntivo de la dermis.



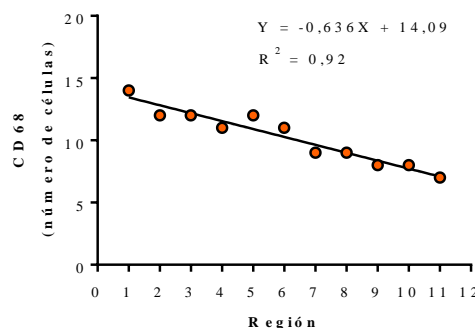
### ***Distribución del Número de Macrófagos CD68+ en la Dermis, en Relación a la Distancia del Borde de la Úlcera***

El mayor número de macrófagos CD68+ se han cuantificado en la dermis del fondo de la úlcera y en las regiones del borde periulceroso, para ir decreciendo a medida que nos alejamos de la úlcera. El estudio estadístico demuestra diferencias significativas ( $p < 0.005$ ) entre la región 1 (borde de la úlcera necrótica) con respecto a la zona periférica de la biopsia cutánea (regiones 9-11. En toda las regiones se evidencia un significativo mayor número de macrófagos CD68+ ( $p < 0.005$ ) en la piel quemada, con respecto de la piel normal.



**Figuras 14 y 15.** Distribución del número de macrófagos CD68+ en las diferentes regiones de la dermis a medida que se alejan del borde ulceroso. 1: borde de úlcera, 11: región de la dermis situada a 5.500 micras del borde ulceroso. Existe una disminución significativa del número de macrófagos en la zona más alejada de la úlcera ( $p < 0.05$ ). También hay diferencias significativas respecto a la piel normal.

Existe una tendencia decreciente significativa de la distribución de macrófagos CD68+ desde el centro hacia la periferia de la biopsia cutánea.



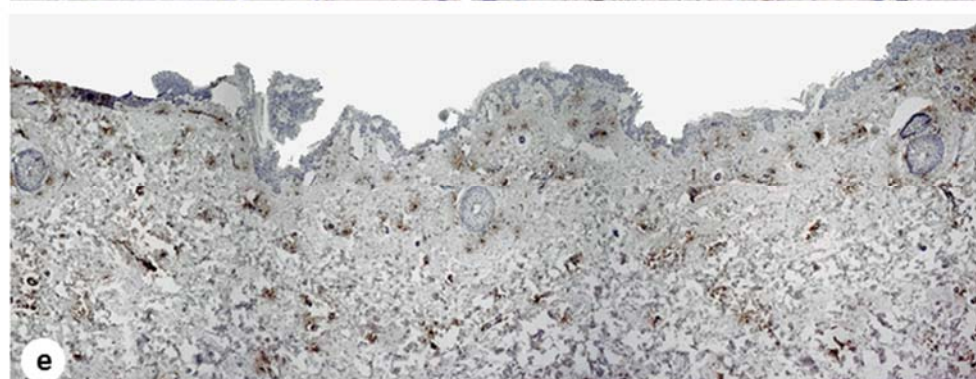
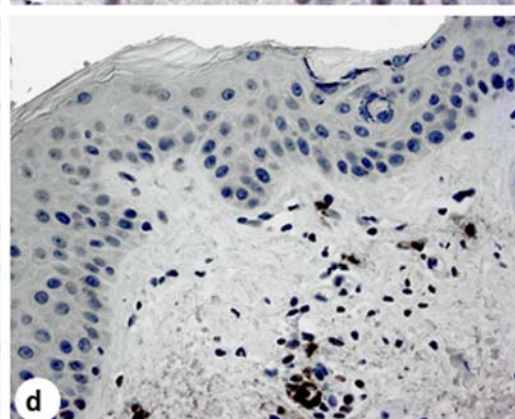
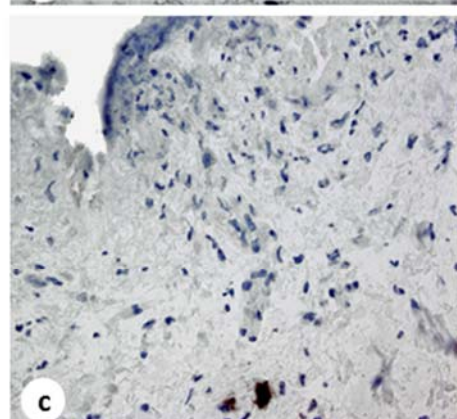
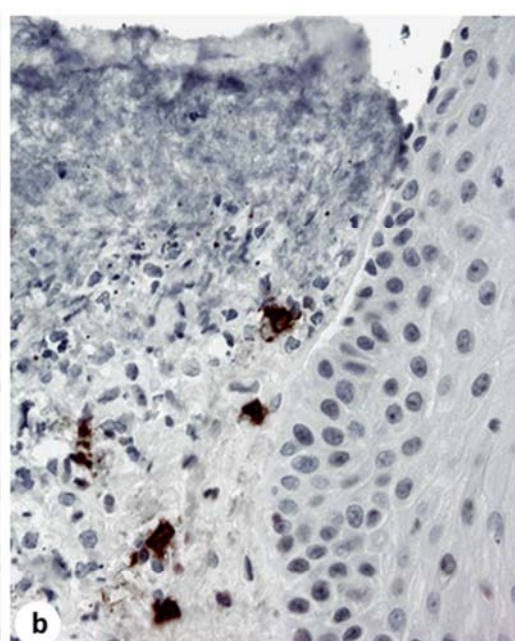
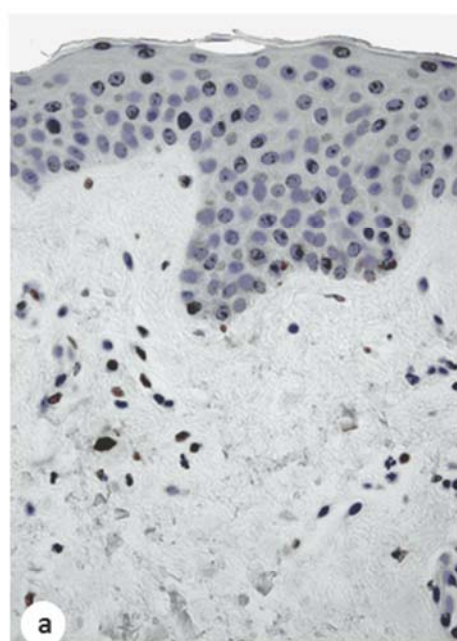
**Figura 16.** Tendencia de la distribución de macrófagos CD68+ en las diferentes regiones de la dermis a medida que se alejan del borde ulceroso. El valor de R da una significación estadística de  $p < 0.005$ .

### ***Estudio de la Infiltración de Células Cebadas Triptasa+ en el Borde de la Úlcera Cutánea por Quemadura***

***Figura 17. Evaluación de las Células Cebadas Triptasa+ en la Úlcera Cutánea Postquemadura***

- a. Biopsia cutánea normal (grupo control) caracterizada por una epidermis y dermis sin cambios histológicos. En la porción intermedia de la dermis se observa una célula cebada con intensa expresión intracitoplásmica granular de triptasa.
- b. Fondo necrótico de una úlcera cutánea próxima a un complejo pilosebáceo. En el borde de la úlcera, el tejido conjuntivo presenta lesiones de necrosis por coagulación y contiene numerosas células cebadas, cuyo citoplasma presenta una intensa expresión granular de triptasa. Se ve degranulación de los gránulos de triptasa+ hacia el tejido conjuntivo adyacente.
- c. En la vecindad de la úlcera, el tejido conjuntivo está desestructurado, edematoso y con disrupción de las fibras de colágeno y contiene varias células cebadas triptasa+.
- d. Piel próxima al lecho ulceroso en la que se aprecian varias células cebadas triptasa+, agrupadas y rodeadas por células inmunocompetentes, localizadas en una dermis edematosa.
- e. Imagen panorámica de áreas de superficie cutánea muy próximas al lecho principal ulceroso. Se observa destrucción multifocal de la epidermis y la dermis adyacente, y la formación de vesículas intraepidérmicas y dermo-epidérmicas que contienen células inflamatorias. La dermis papilar subyacente está edematosa y contiene, además de varios tipos de células inmunocompetentes, una intensa migración de las células cebadas triptasa+ que se disponen aisladamente o en pequeños acúmulos a todo lo largo de la piel quemada.

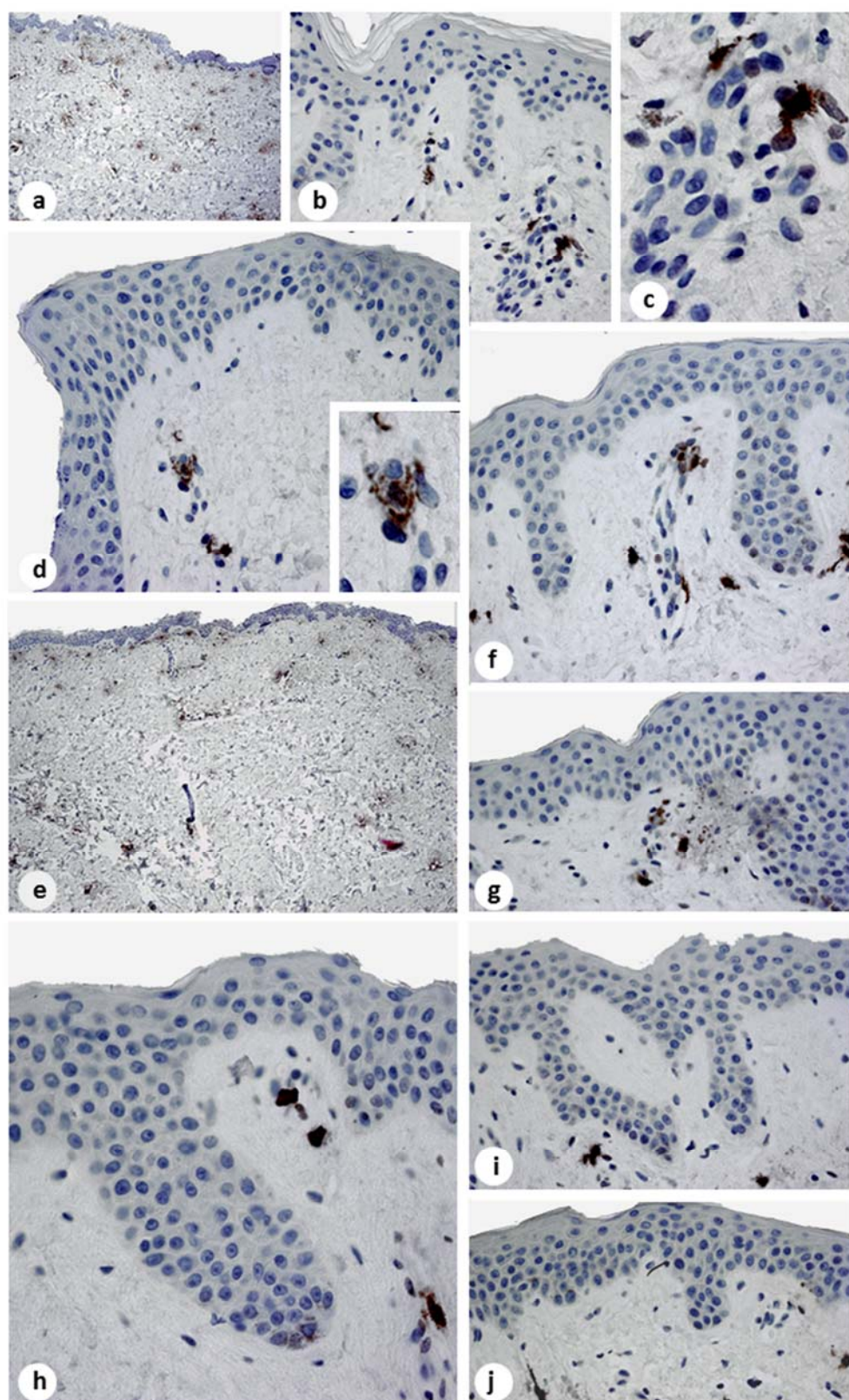




**Figura 18. Evaluación de las Células Cebadas Triptasa+ en la Zona Media y Distal de la Piel Quemada**

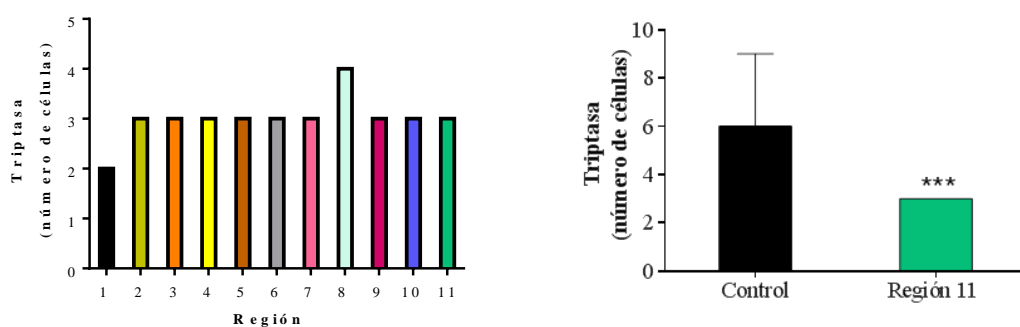
- a. Imagen panorámica de la región media de la piel extirpada de un caso con una extensa quemadura profunda (quemadura tipo III). La superficie epidérmica está conservada, pero la dermis presenta abundantes focos de infiltrados inflamatorios crónicos y gran cantidad de células cebadas triptasa+.
- b. Detalle de gran aumento de la región media de la biopsia cutánea en la que aparentemente la epidermis y la dermis papilar son completamente normales; sin embargo, se visualizan pequeños focos de infiltrados linfocitarios perivasculares y perineurales, así como la existencia de escasas células triptasa+.
- c. Detalle de la imagen anterior. Se observa diferente grado de degranulación de las células cebadas, identificando gránulos triptasa+ dispersos en la matriz extracelular.
- d. En otro caso, tampoco se ven lesiones en las zonas de piel alejadas de la úlcera postquemadura. No obstante, llama la atención la presencia de pequeños nidos de células triptasa+. **Inset:** evidente degranulación de las células cebadas.
- e. Porción externa (borde quirúrgico) de la biopsia cutánea en otro caso de quemadura. Persiste el incremento significativo del número de células cebadas, de disposición perivascular y perineural. Nótese asimismo la presencia de gránulos triptasa+ dispersos por la matriz extracelular.
- f. Se ven células cebadas aisladas o alrededor de terminaciones nerviosas de la dermis. La piel no presenta cambios histológicos.
- g. Borde quirúrgico cutáneo. La epidermis y la dermis son aparentemente normales y no se observa ninguna lesión de quemadura, ni edema del tejido conjuntivo; sin embargo, destacan pequeños acúmulos de células cebadas triptasa+ y, puntualmente, algunos gránulos triptasa+ en el seno de la matriz extracelular.
- h. En los bordes externos, a veces las células cebadas se acumulan en la dermis papilar asociándose a una leve degeneración de la matriz extracelular.
- i, j. En otro caso, también en la zona más periférica de la biopsia cutánea se pueden observar numerosas crestas epidérmicas y papilas dérmicas, pero sin cambios histológicos. El número de células cebadas triptasa+ en la piel normal es relativamente bajo.





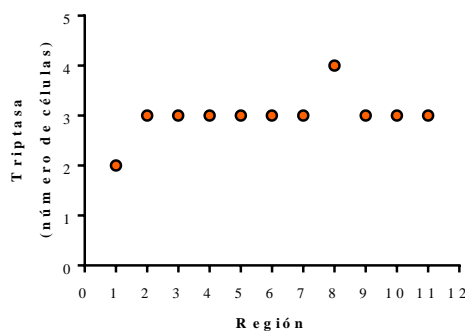
### ***Distribución del Número de Células Cebadas Triptasa+ en la Dermis, en Relación a la Distancia del Borde de la Úlcera***

El estudio histométrico de la distribución de las células cebadas triptasa+ sigue un comportamiento diferente al de las células inmunocompetentes, de modo que el número de células triptasa+ en las diferentes regiones de la piel quemada es significativamente inferior ( $p < 0.005$ ) que en la piel normal (grupo control). Sin embargo, el número de células cebadas en cada una de las regiones cutáneas es similar, no encontrando diferencias significativas.



**Figuras 19 y 20.** Distribución del número de células cebadas triptasa+ en las diferentes regiones de la dermis a medida que se alejan del borde ulceroso. 1: borde de úlcera, 11: región de la dermis situada a 5.500 micras del borde ulceroso. No hay diferencias estadísticas entre cada región, pero sí se encuentra una significación ( $p < 0.05$ ) con respecto a la piel normal.

No se ha encontrado ningún patrón de diferencia de las células cebadas triptasa+ en la piel quemada.

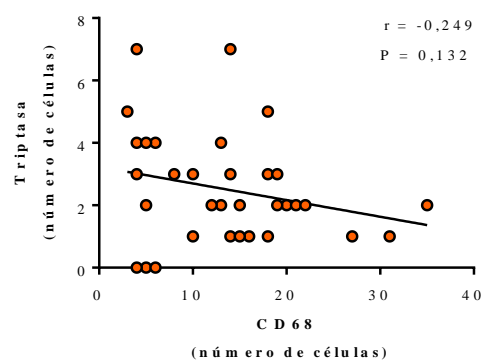
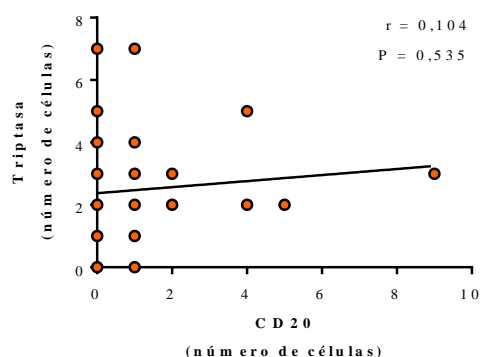
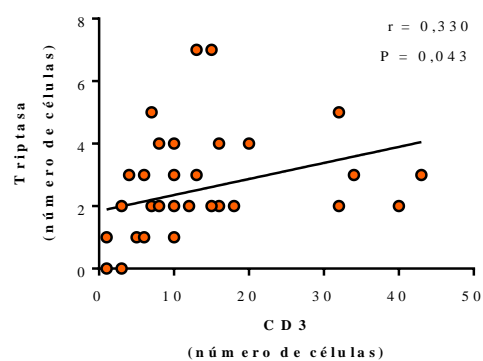
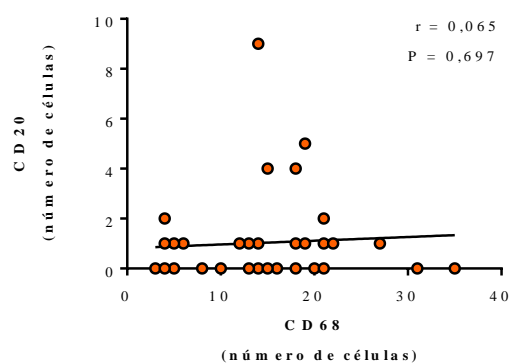
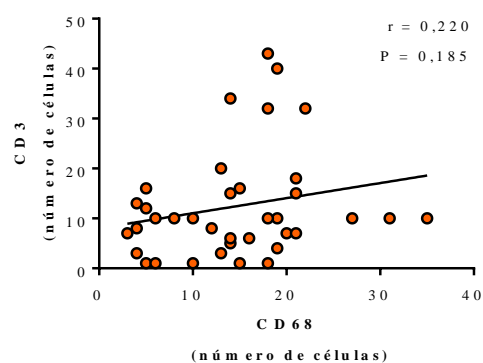
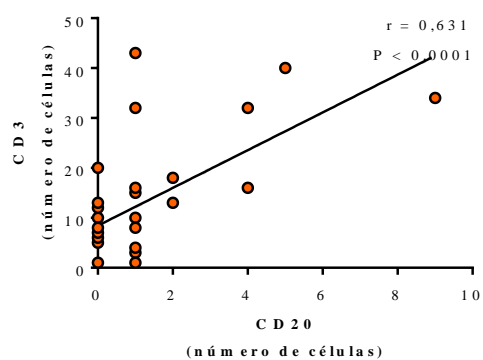


**Figura 21.** Tendencia de la distribución de células cebadas triptasa+ en las diferentes regiones de la dermis a medida que se alejan del borde ulceroso. No se ha encontrado una distribución segmentaria significativa en las diferentes regiones de la biopsia cutánea.



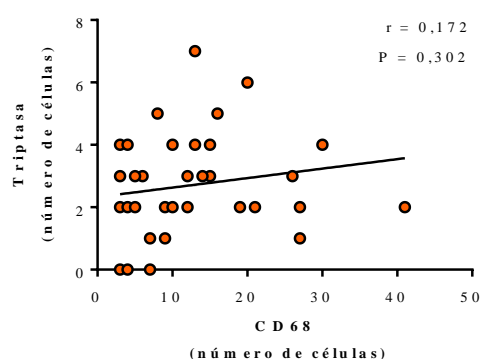
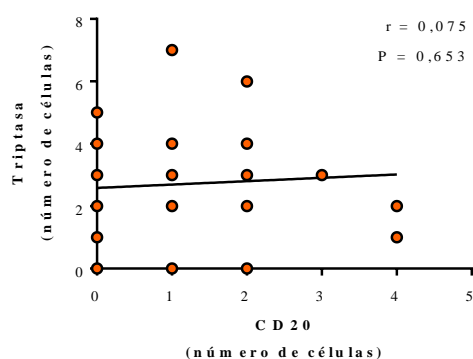
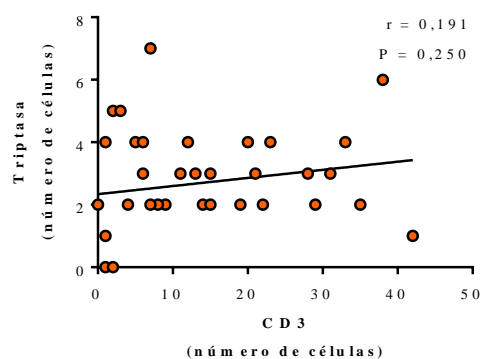
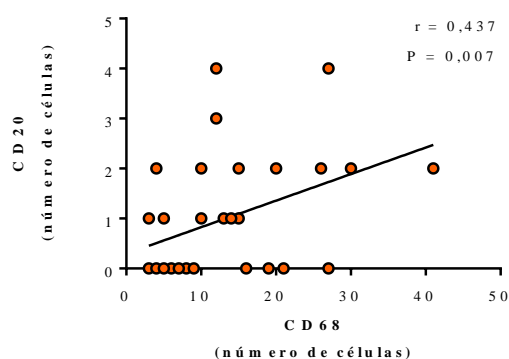
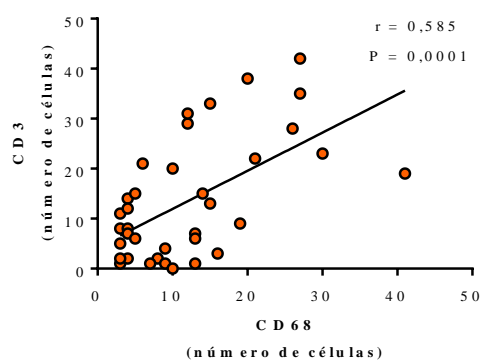
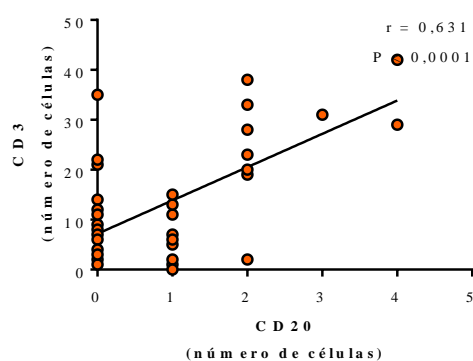
## Correlaciones de la Distribución de las Células Inmunocompetentes en las Diferentes Regiones de la Dermis, en Relación a la Distancia del Borde de la Úlcera

### Correlaciones – Región I (Figs. 22-27)



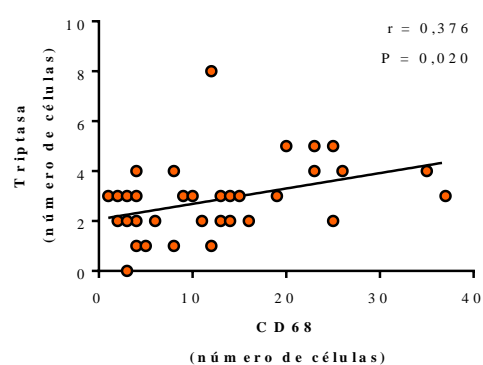
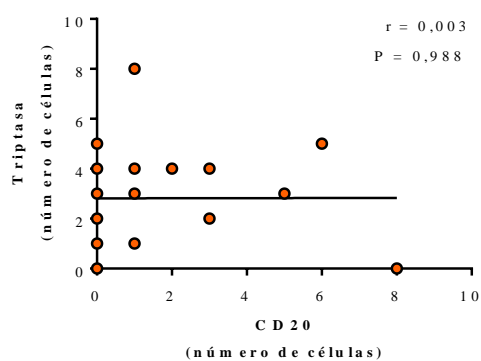
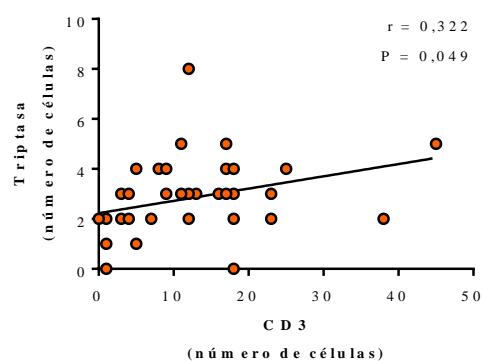
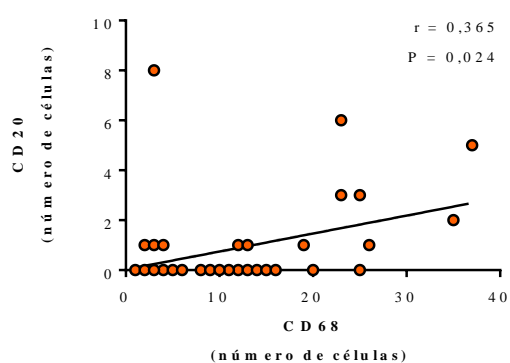
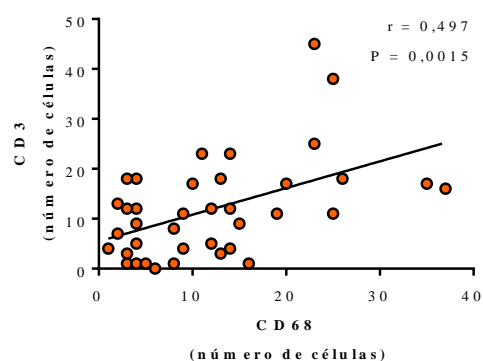
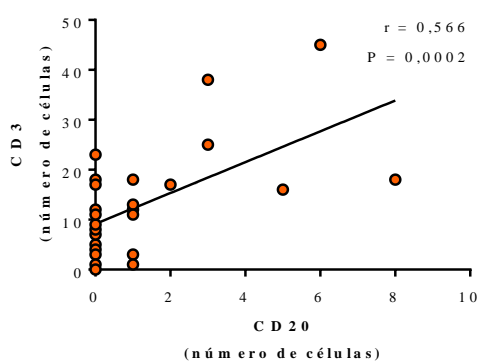
## Correlaciones de la Distribución de las Células Inmunocompetentes en las Diferentes Regiones de la Dermis, en Relación a la Distancia del Borde de la Úlcera

### Correlaciones – Región II (Figs. 28-33)



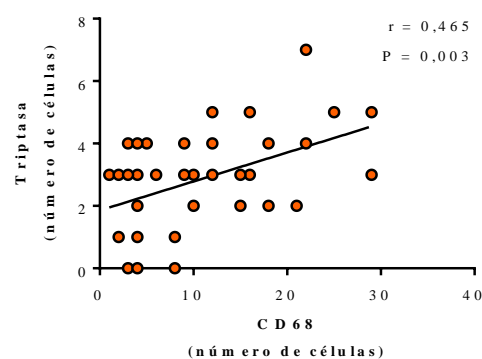
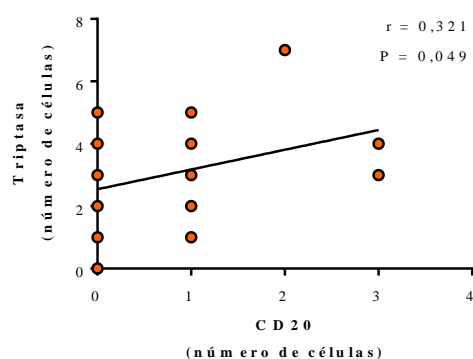
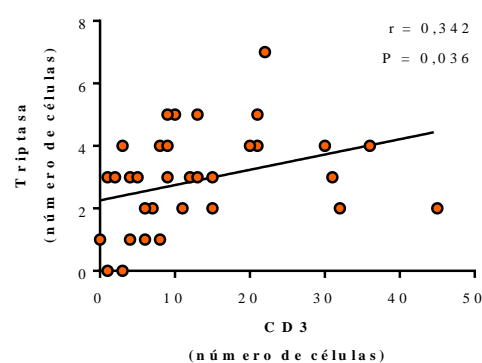
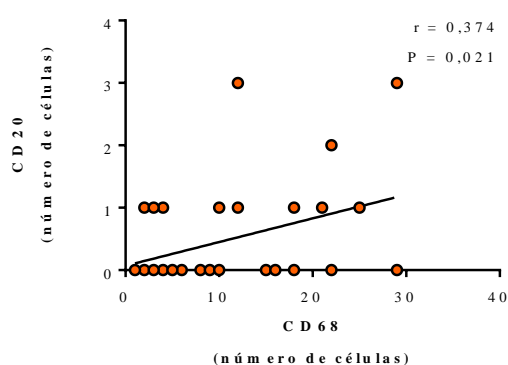
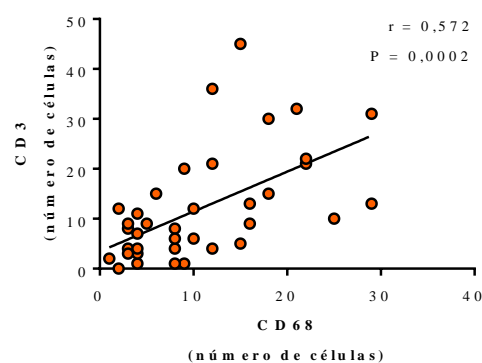
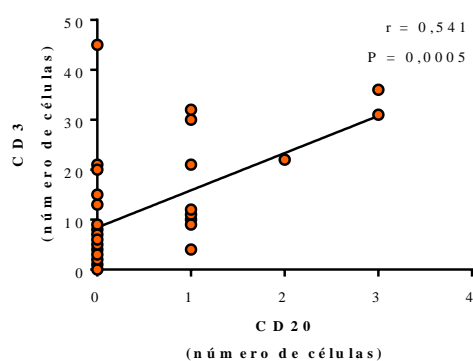
## ***Correlaciones de la Distribución de las Células Inmunocompetentes en las Diferentes Regiones de la Dermis, en Relación a la Distancia del Borde de la Úlcera***

### **Correlaciones – Región III (Figs. 34-39)**



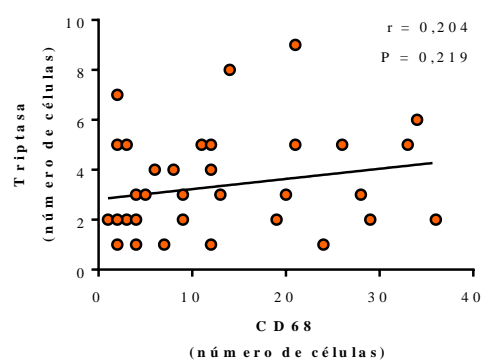
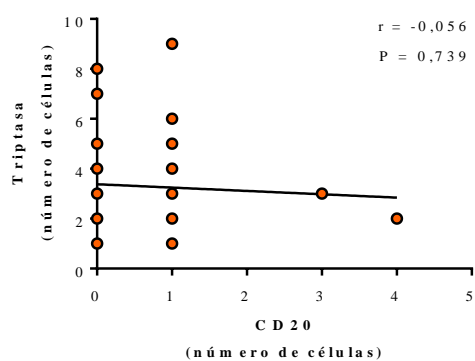
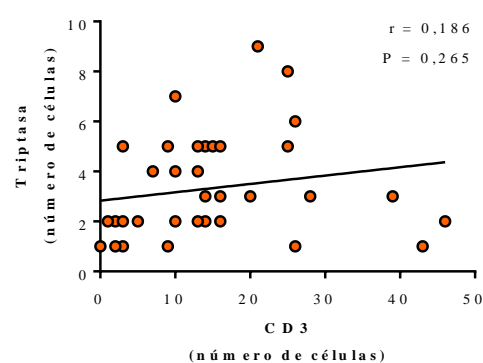
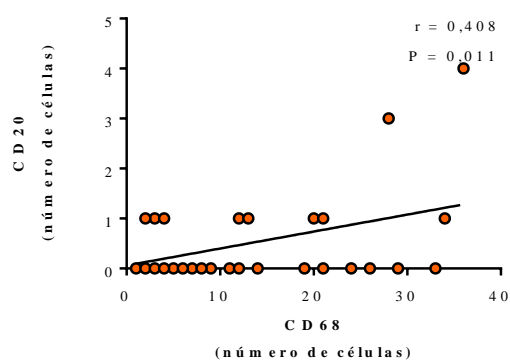
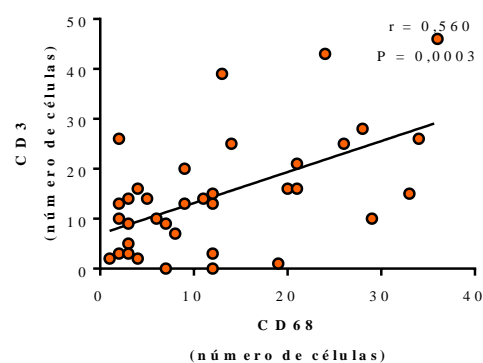
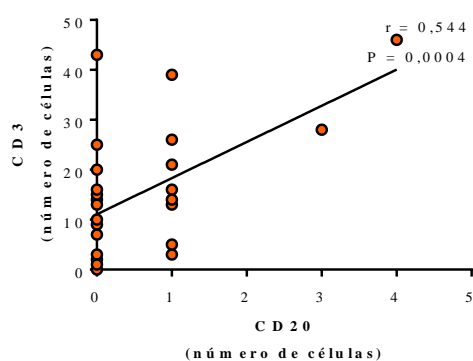
## Correlaciones de la Distribución de las Células Inmunocompetentes en las Diferentes Regiones de la Dermis, en Relación a la Distancia del Borde de la Úlcera

### Correlaciones – Región IV (Figs. 40-45)



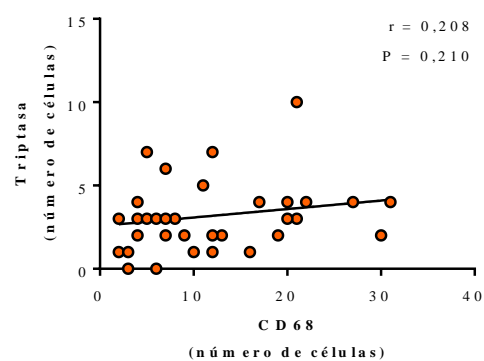
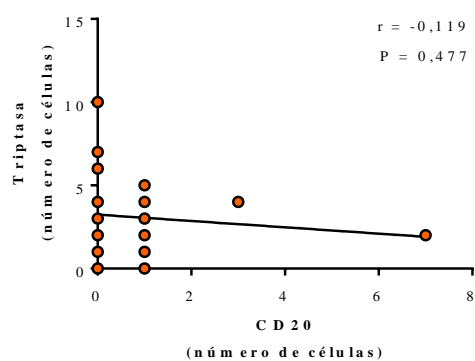
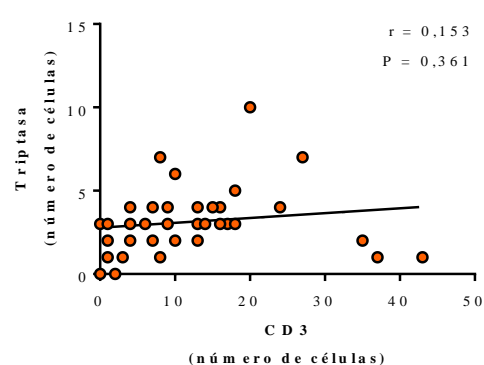
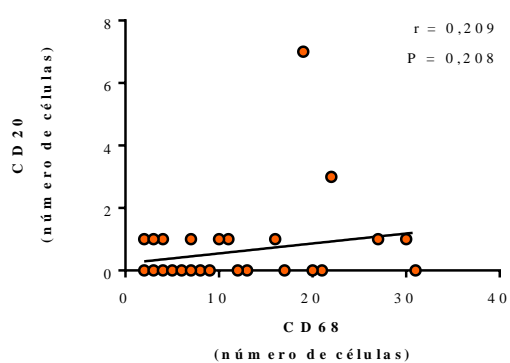
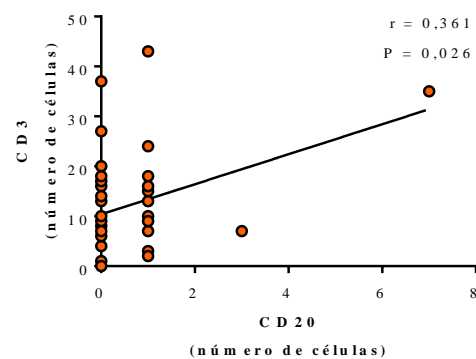
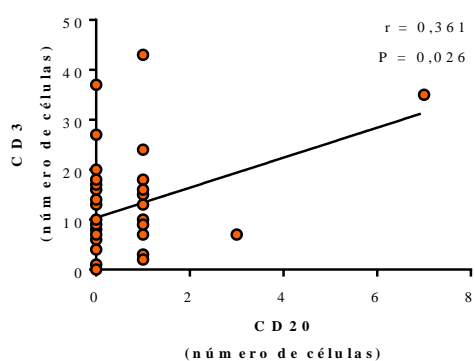
## Correlaciones de la Distribución de las Células Inmunocompetentes en las Diferentes Regiones de la Dermis, en Relación a la Distancia del Borde de la Úlcera

### Correlaciones – Región V (Figs. 46-51)



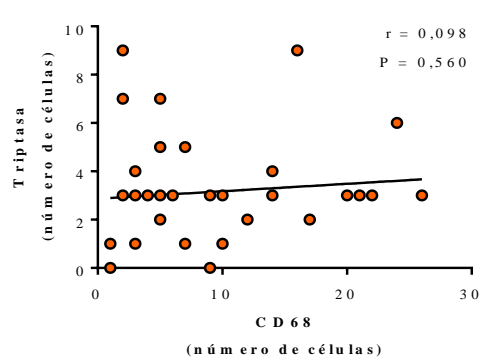
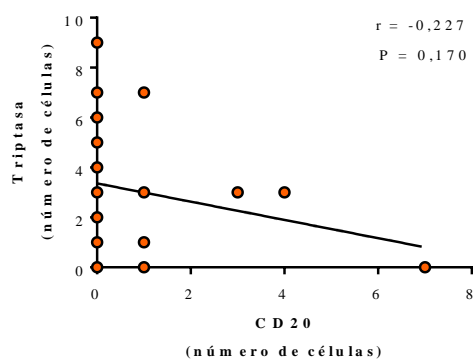
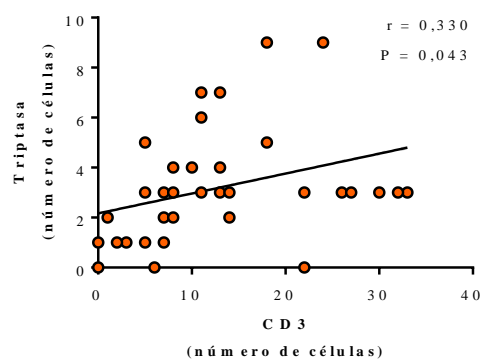
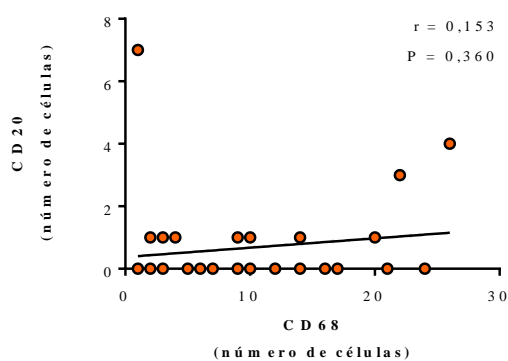
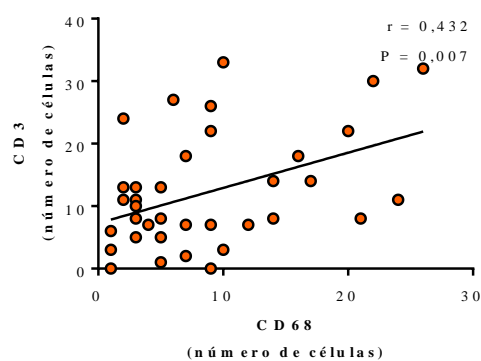
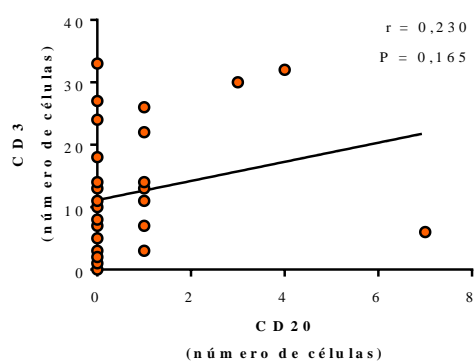
## ***Correlaciones de la Distribución de las Células Inmunocompetentes en las Diferentes Regiones de la Dermis, en Relación a la Distancia del Borde de la Úlcera***

### **Correlaciones – Región VI (Figs. 52-57)**



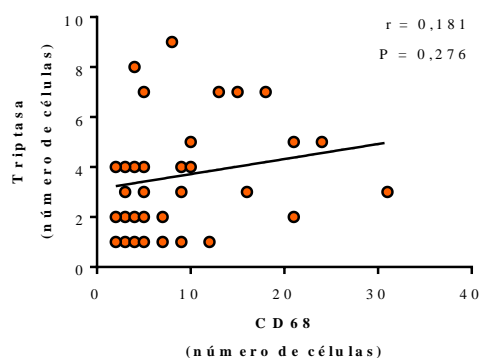
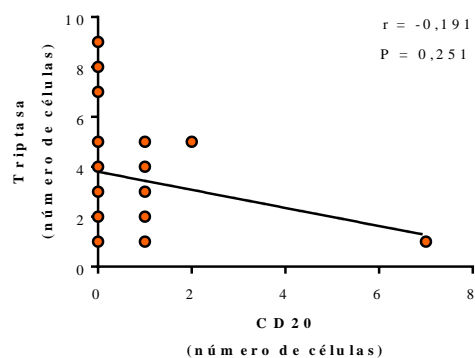
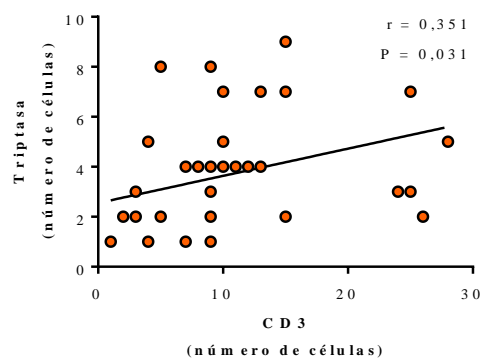
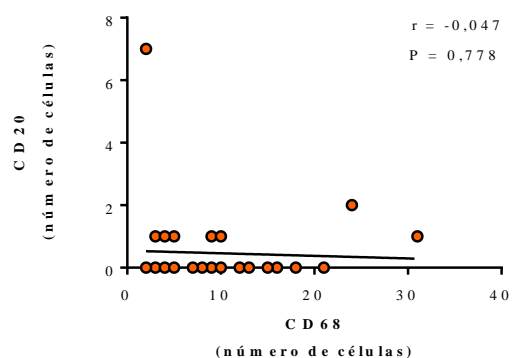
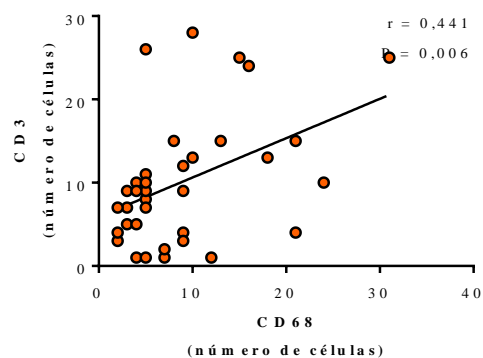
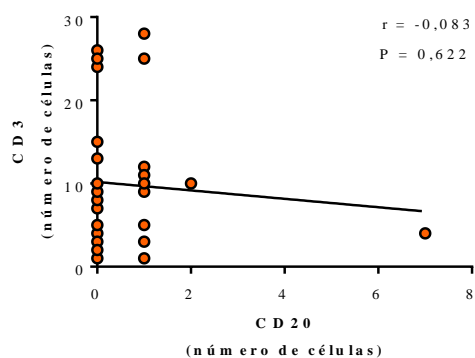
## Correlaciones de la Distribución de las Células Inmunocompetentes en las Diferentes Regiones de la Dermis, en Relación a la Distancia del Borde de la Úlcera

### Correlaciones – Región VII (Figs. 58-63)



## Correlaciones de la Distribución de las Células Inmunocompetentes en las Diferentes Regiones de la Dermis, en Relación a la Distancia del Borde de la Úlcera

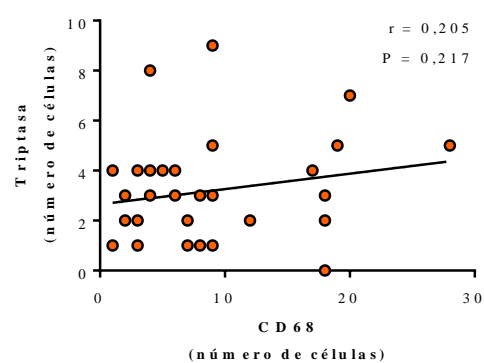
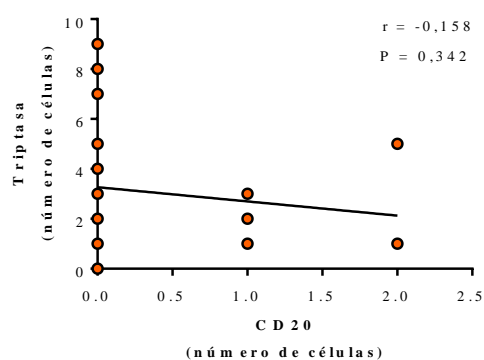
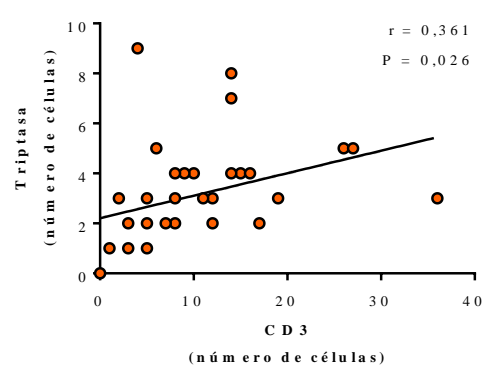
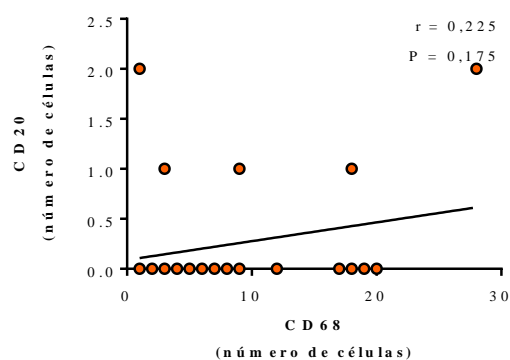
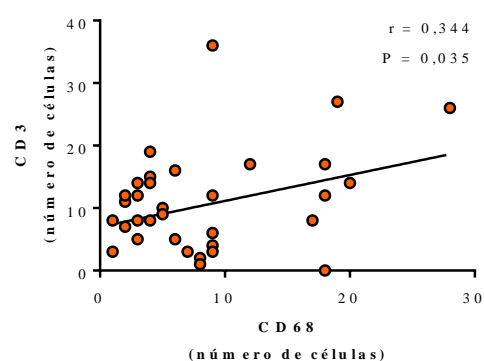
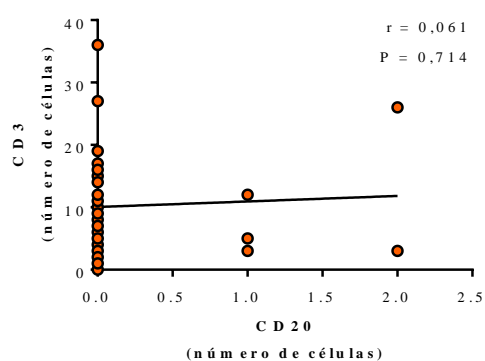
### Correlaciones – Región VIII (Figs. 64-69)





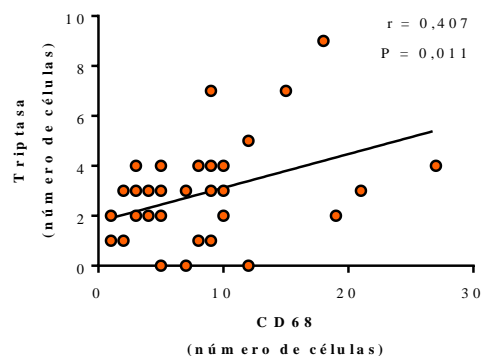
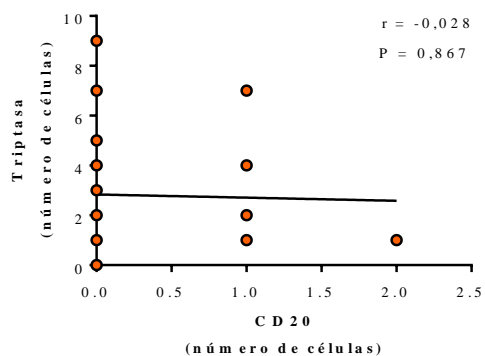
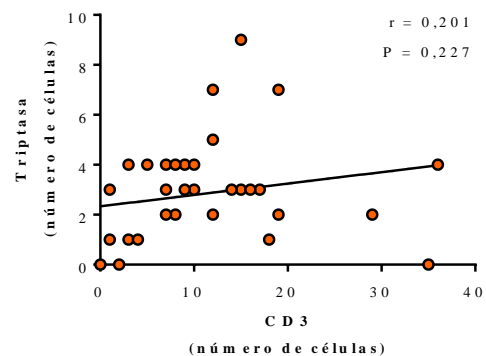
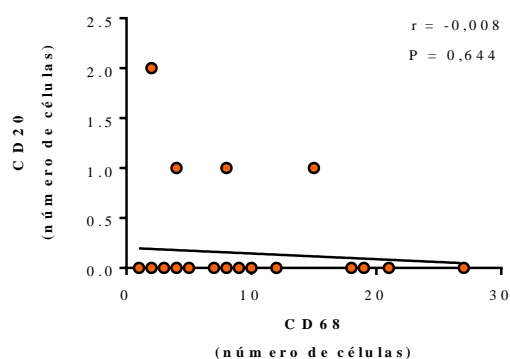
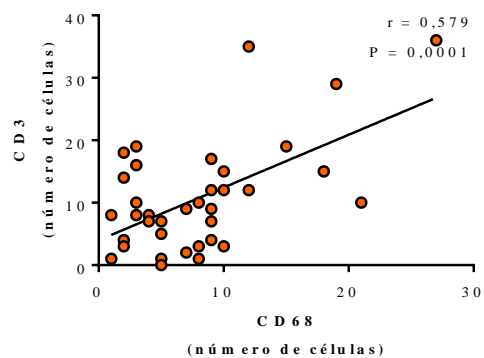
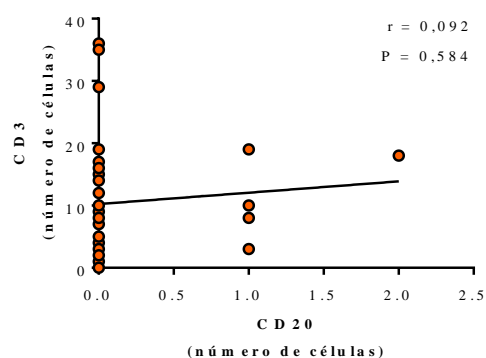
## Correlaciones de la Distribución de las Células Inmunocompetentes en las Diferentes Regiones de la Dermis, en Relación a la Distancia del Borde de la Úlcera

### Correlaciones – Región IX (Figs. 70-75)



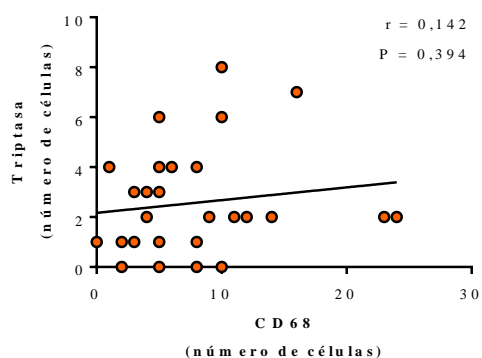
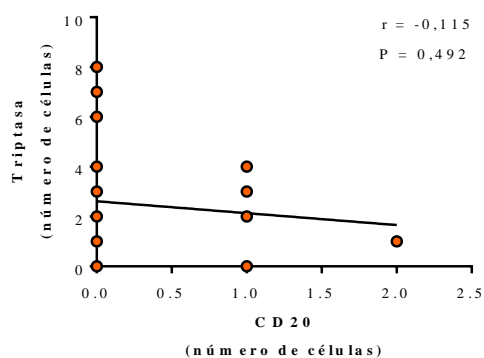
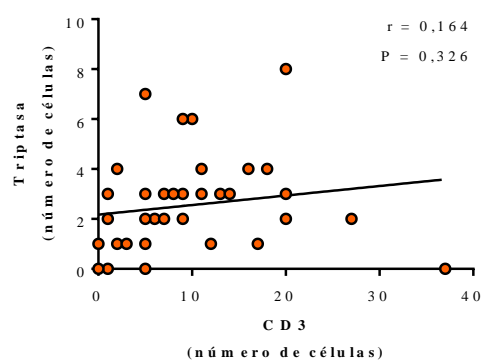
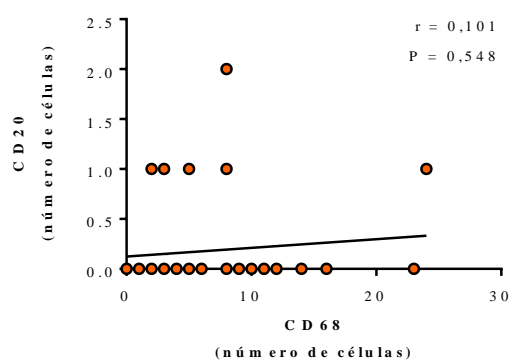
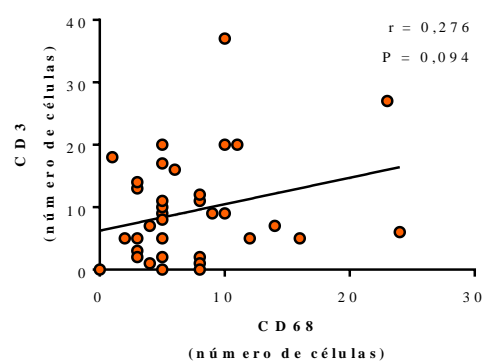
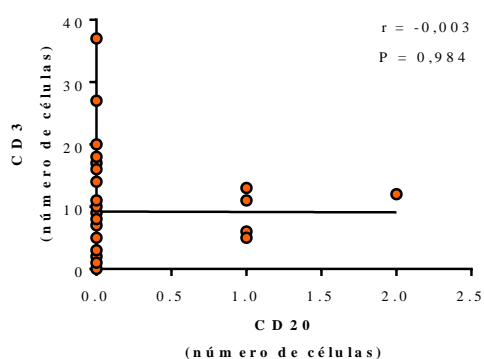
## Correlaciones de la Distribución de las Células Inmunocompetentes en las Diferentes Regiones de la Dermis, en Relación a la Distancia del Borde de la Úlcera

### Correlaciones – Región X (Figs. 76-81)



## Correlaciones de la Distribución de las Células Inmunocompetentes en las Diferentes Regiones de la Dermis, en Relación a la Distancia del Borde de la Úlcera

### Correlaciones – Región XI (Figs. 82-87)



## ESTUDIO DE LA ANGIOGÉNESIS Y DE LA LINFANGIOGÉNESIS EN EL BORDE DE LA ÚLCERA CUTÁNEA POR QUEMADURA

En esta Tesis Doctoral se han investigado las características histológicas de los cambios que pudieran experimentar la microvasculatura sanguínea y la linfática, usando respectivamente el anticuerpo anti-CD31 y el anticuerpo anti- D2-40 (podoplanina). De este modo se pretende valorar si en la piel que rodea a la úlcera por quemadura se producen mecanismos de angiogénesis y linfangiogénesis.

Es bien conocido, que en la piel normal existe una amplia distribución de la microvasculatura capilar y linfática, siendo mayor su densidad en la dermis papilar que en la dermis reticular. El estudio de la expresión del anticuerpo anti CD31+ en el citoplasma de las células endoteliales de los vasos sanguíneos permite efectuar una perfecta visualización de los capilares de la dermis papilar y de la dermis reticular, los cuales son más abundantes en la dermis papilar. También se observan algunas vénulas dilatadas y pequeñas venas cuyas células endoteliales son, así mismo, CD31+. El tejido conjuntivo de la dermis papilar normal es laxo y contiene, además de abundantes capilares, células inmunocompetentes, células cebadas y abundante matriz extracelular, estando las fibras de colágeno poco compactadas y dispuestas al azar.

En la piel quemada, se identifica un aumento de la microvasculatura CD31+ en los bordes inflamatorios periulcerosos. En estas áreas de ulceración es muy frecuente apreciar capilares con luz dilatada, con pared engrosada, y migración de leucocitos y células inmunocompetentes, sobre todo linfocitos T CD3+ que atraviesan el citoplasma de las células endoteliales CD31+. En las zonas más próximas a la úlcera cutánea (regiones 2-4) se observa siempre rarefacción del tejido conjuntivo, incremento de la matriz extracelular, edema intersticial y numerosos microvasos dilatados y delimitados por un revestimiento continuo de células endoteliales CD31+. Sin embargo, a medida que nos separamos del borde inflamatorio ulceroso, sobre todo en las zonas más periféricas próximas al borde quirúrgico, se observan capilares, vénulas y pequeñas venas histológicamente normales. En definitiva, en el presente estudio, aunque la densidad de volumen ocupada por vasos sanguíneos es significativamente mayor en la piel de los pacientes quemados que en el grupo control, no se

han encontrado imágenes evidentes de proliferación vascular de tipo angiogénico. Estos hallazgos histológicos quedan más explícitamente documentados en los pies de figura y en las imágenes histológicas incluidas entre las páginas 67-68.

Respecto de la histología de los vasos linfáticos, la exploración del anticuerpo antipodoplanina (D2-40) en la piel normal demuestra la presencia de numerosos capilares linfáticos que tienen una distribución más abundante en la dermis reticular que en la dermis papilar. Estos capilares linfáticos generalmente tienen una forma elongada de contorno más irregular y en ocasiones su luz está colapsada, formando pequeñas hendiduras linfáticas con intensa expresión de D2-40 en el citoplasma de las células del endotelio linfático. El número de pequeños capilares linfáticos en la dermis papilar es aparentemente menor que el de capilares sanguíneos.

En las biopsias cutáneas de pacientes quemados, cuando se estudia la distribución de los vasos linfáticos D2-40, se observa un comportamiento dual: de una parte, la zona central periulcerosa contiene abundantes vasos linfáticos; de otra, en las zonas medias y sobre todo periféricas de la biopsia cutánea, el número de vasos linfáticos es menor y semejante a lo observado en la piel normal.

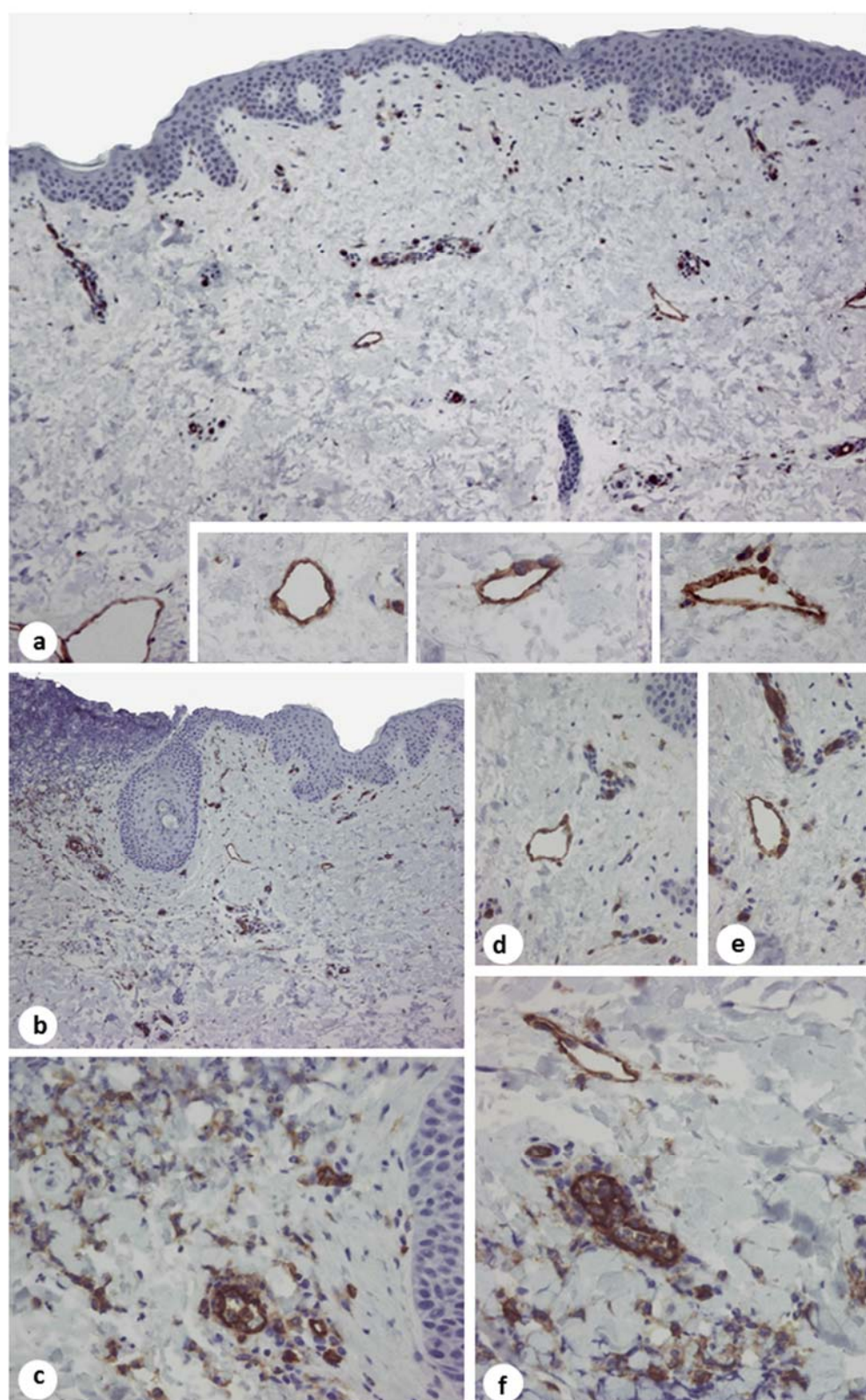
En el tejido inflamado periulceroso, se ven abundantes capilares linfáticos dilatados, se observa una rotura de la pared y una expresión discontinua del epitopo D2-40 en el endotelio linfático, existiendo una intensa migración de leucocitos polimorfonucleares y de otras células inflamatorias crónicas, sobre todo en las áreas de edema de la matriz del tejido conjuntivo. Según nos vamos alejando del foco ulceroso, las zonas media y externa de la biopsia cutánea presentan pequeños cambios de rarefacción en la matriz extracelular y nidos focales de células inmunocompetentes; en estas áreas, la distribución de los capilares linfáticos D2-40+ es semejante a la de la piel normal (Grupo Control). En la piel quemada, no se han objetivado imágenes de linfangiogénesis. La documentación iconográfica de la distribución de los capilares linfáticos D2-40+ se puede visualizar en la página 69.

La cuantificación morfométrica de los microvasos sanguíneos CD31+ y los capilares linfáticos D2-40+ en las 6 regiones de la biopsia cutánea, así como su tendencia de distribución en estas regiones se documenta en la página 70.

***Estudio de la Distribución de la Microvasculatura Sanguínea y Linfática en el Borde de la Úlcera Cutánea por Quemadura***

***Figura 88. Evaluación de la Microvasculatura Sanguínea CD 31+ en la Úlcera Cutánea Postquemadura***

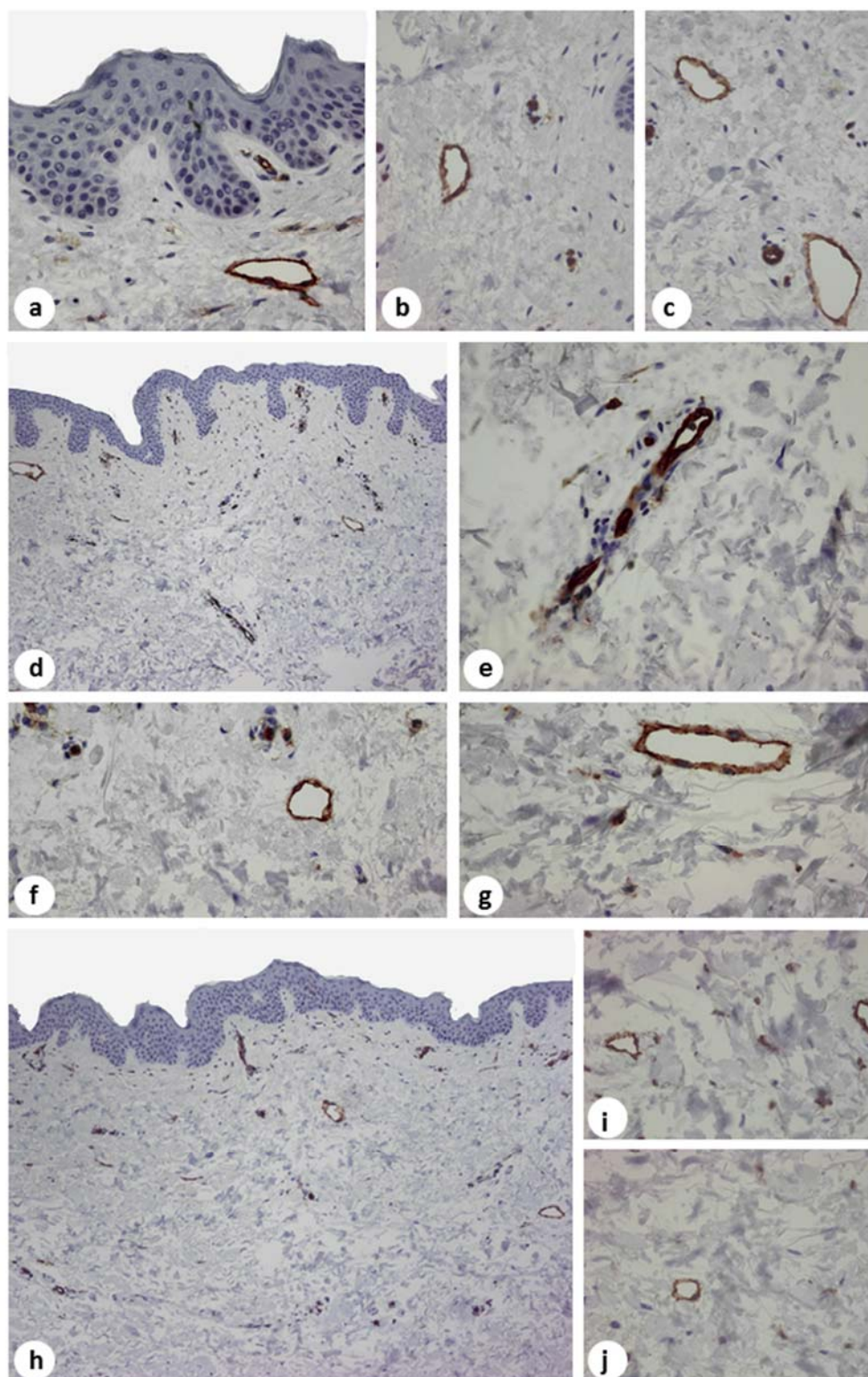
- a. Imagen panorámica de piel normal (Grupo Control). Se observan numerosos vasos sanguíneos capilares y venulares en la dermis media y en la dermis profunda. La dermis papilar contiene escasos capilares. **Inset:** Detalle del revestimiento endotelial CD31+ con intensa tinción del citoplasma de las células endoteliales.
- b. Úlcera cutánea con un lecho necrótico rodeado por abundantes células inflamatorias. Alejado de la úlcera se observan vasos sanguíneos de tipo capilar o venular, con endotelio CD31+, aparentemente normales.
- c. En el fondo del tejido necrótico ulcerosos se observan algunos capilares que muestran engrosamiento del revestimiento endotelial CD31+ y la migración de linfocitos a través del citoplasma endotelial.
- d,e. Dos ejemplos de capilares dilatados e irregulares en la vecindad de la zona ulcerada necrótica. En el intersticio se observan algunos infiltrados de células inflamatorias.
- f. Base de la zona necrótica ulcerada. Se ven capilares irregulares y algunos contienen células inmunocompetentes que migran a través de la pared endotelial.





***Figura 89. Evaluación de la Microvasculatura y de los Procesos de Angiogénesis CD31+ en la Zona Media y Distal de la Piel Quemada***

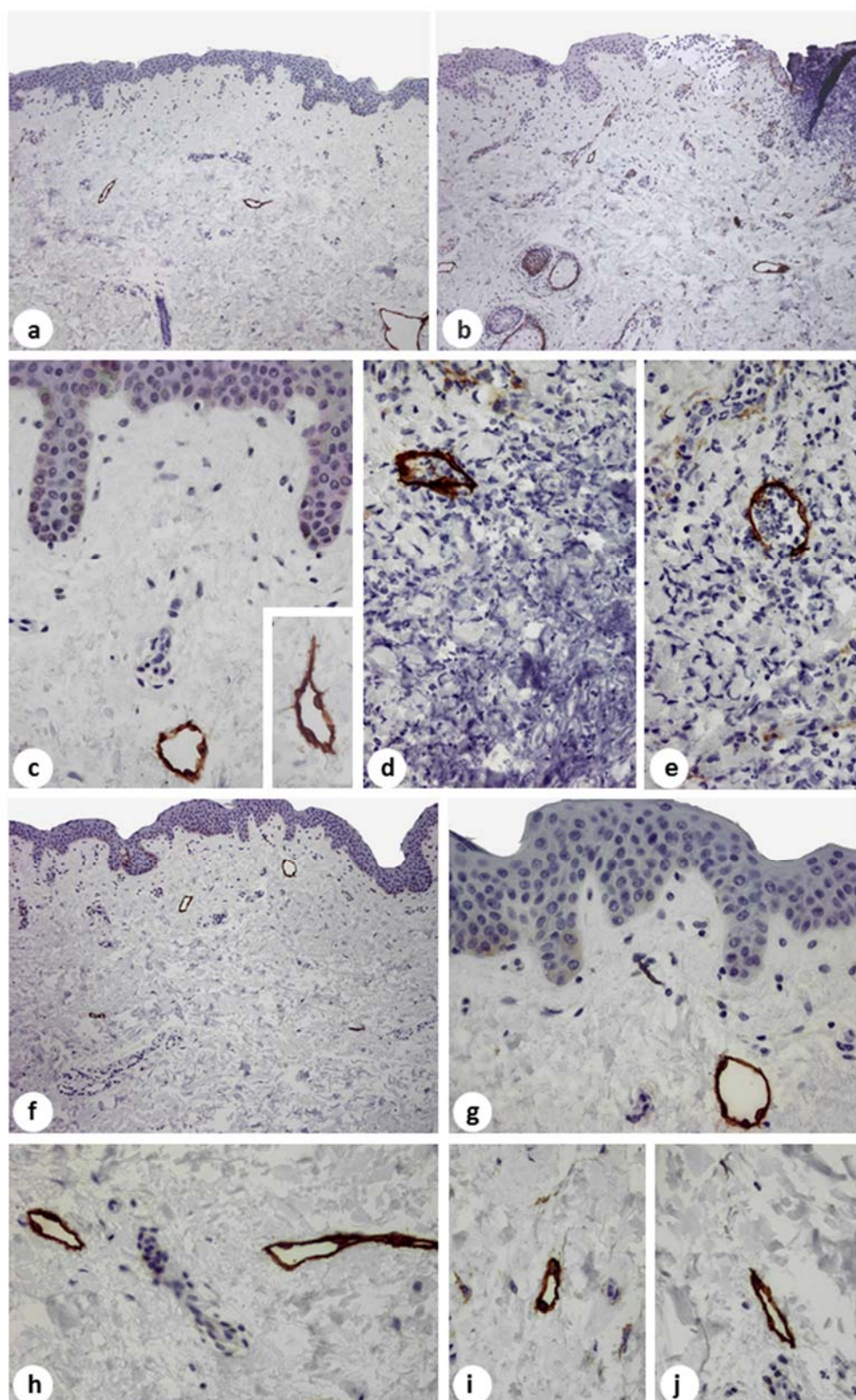
- a. Detalle de la región media de la biopsia cutánea. La epidermis y la dermis aparentemente son normales. Se observa una vénula elongada de contorno irregular con expresión circunferencial concéntrica de CD31+.
- b, c. Detalle de una zona edematosa, con rarefacción de la matriz extracelular, de la región media de la biopsia. Se ven capilares dilatados revestido por células endoteliales CD31+.
- d. Región media del tejido cutáneo periulceroso en el que se observan capilares y vénulas inmunomarcadas con un anticuerpo anti-CD31. Las células endoteliales son poco prominentes.
- e. Corte longitudinal de un capilar muy elongado y de luz virtual. El revestimiento endotelial es continuo e intensamente CD31+.
- f. Importante edema y degeneración de las fibras de colágeno y de la matriz extracelular. En el centro de la imagen se ve un capilar ligeramente dilatado, constituido por células endoteliales, planas y con intensa expresión de CD31+.
- g. Existe una zona edematosa (y artefactada), con rotura de fibras de colágeno y lesiones de necrosis coagulativa del tejido conjuntivo. En el centro de la imagen se observa un corte oblicuo de una vénula tapizada por células endoteliales aplanadas e intensamente CD31+.
- h. Región más externa en el límite del borde quirúrgico. La piel es completamente normal y en esta imagen panorámica se observan varios capilares que se localizan en las papilas dérmicas y también se ven varios capilares y vénulas en el espesor de la dermis reticular.
- i, j. En la zona periférica próxima al borde quirúrgico, se observan varios vasos capilares irregulares CD31+.



***Figura 90. Evaluación del Epítotope D2-40 del Endotelio Linfático en la Zona Media y Distal de la Piel Quemada***

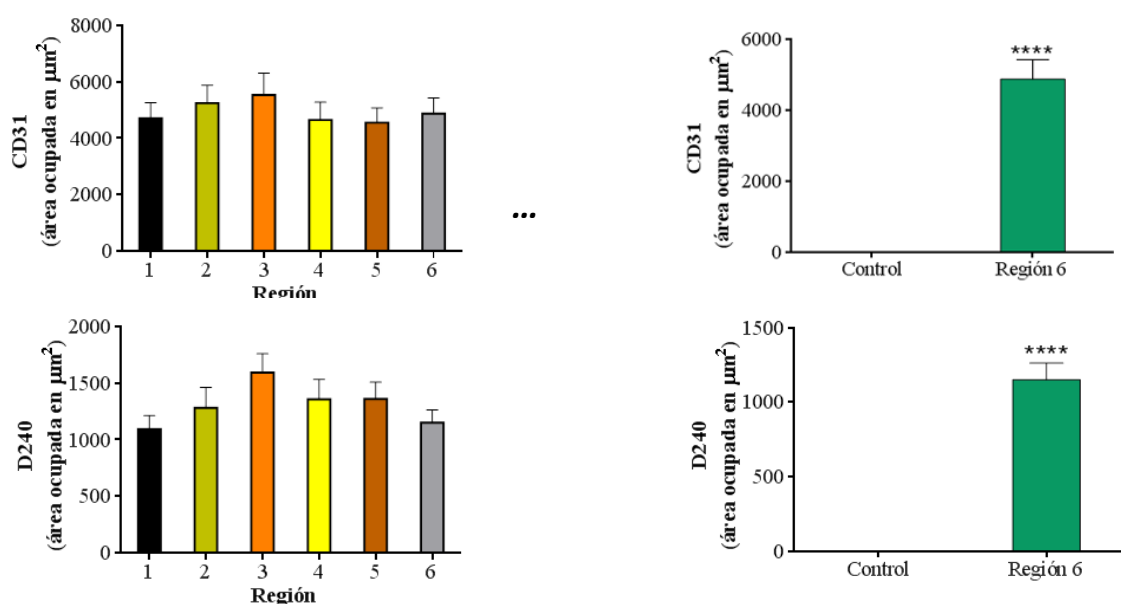
- a. Imagen panorámica de piel normal (caso control). En la dermis se visualizan varios capilares y vénulas linfáticas, con intensa expresión de D2-40 en el endotelio linfático; sin embargo, el endotelio de los vasos sanguíneos no presenta inmunomarcaje.
- b. Úlcera cutánea y tejido periulceroso postquemadura. La epidermis y la dermis superficial están necrosadas; además, en la vecindad de la úlcera se ve una vesícula dermo-epidérmica. El tejido conjuntivo de la dermis reticular está edematoso y contiene células inmunocompetentes y abundantes vasos capilares de tipo linfático, con intensa expresión de D2-40 en el citoplasma del revestimiento endotelial.
- c. Imagen a gran aumento de la piel muy próxima a la ulceración. Nótese edema y destrucción de colágeno de la dermis reticular y la presencia de un vaso linfático (posiblemente una vénula linfática), con intensa inmunoexpresión de D2-40. **Inset:** detalle de una vénula linfática irregular, tapizada por un endotelio continuo D2-40+.
- d. Fondo necrótico en el que se observan numerosos detritus celulares, y abundantes bacterias. Destaca la presencia de una estructura vascular inmunomarcada con el anticuerpo anti-podoplanina (anti-D2-40) que identifica las células endoteliales. La luz de este vaso linfático contiene células linfocitarias que migran a través de su pared.
- e. En otro campo microscópico se ve una solución de continuidad en el endotelio linfático inmunomarcado, con migración de leucocitos polimorfonucleares.
- f. La región intermedia de la biopsia cutánea presenta epidermis y dermis aparentemente normales, y se identifican capilares y vénulas linfáticas, con endotelio D2-40+.
- g. Extremo externo próximo al borde quirúrgico. La piel es histológicamente normal. Se ve una vénula linfática con endotelio continuo, e intensa expresión de D2-40+.
- h-j. Se observan diferentes tipos de capilares linfáticos en la dermis de los bordes quirúrgicos de varios casos de quemadura cutánea. Tanto los capilares linfáticos, como las hendiduras linfáticas, están revestidos por un endotelio con intensa expresión de podoplanina.





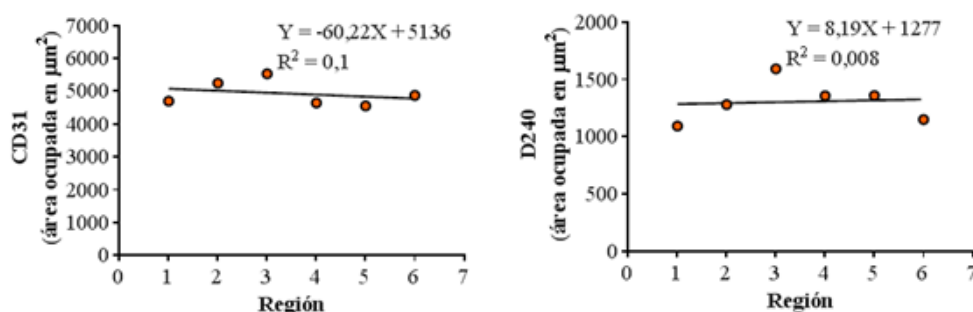
### ***Distribución del Número de Vasos Sanguíneos y Vasos Linfáticos de la Dermis, en Relación a la Distancia del Borde de la Úlcera***

Existe un número de microvasos sanguíneos y vasos linfáticos significativamente mayor en la piel quemada que en la piel normal ( $p < 0.005$ ); pero la distribución de ambos tipos de vasos no cambia en las diferentes regiones de la piel periulcerosa.



**Figuras 91-94.** Área ocupada por microvasos sanguíneos y linfáticos por superficie de  $100.000 \mu^2$  de dermis, en cada una de las 6 regiones cutáneas a medida que se alejan de la úlcera. (Región 1: borde periulceroso, Región 6: proximidad de la extirpación de la úlcera). CD31: vasos sanguíneos y D2-40: vasos linfáticos. Diferencias significativas de cada una de las regiones con respecto al control.

La valoración estadística de la tendencia de distribución de vasos no sigue ningún patrón característico.



**Figuras 95 y 96.** Tendencia de la distribución de microvasos sanguíneos CD31+ y de capilares linfáticos D2-40+ en las diferentes regiones de la dermis a medida que se alejan del borde ulceroso. Las rectas de regresión son planas y no se ha encontrado significación estadística.

## DISCUSIÓN

El estudio histopatológico de la biopsia cutánea, tomada durante el desbridamiento de las quemaduras, sigue siendo el mejor método para la evaluación de la profundidad de la quemadura, su progresión y la curación de la misma.<sup>54</sup> Sin embargo, existe escasa información en la literatura consultada acerca de los cambios tisulares que se producen en las quemaduras, y son todavía más escasos los datos publicados acerca del inmunofenotipo de los infiltrados inflamatorios situados en los bordes cutáneos de pacientes quemados.

En relación con los cambios histopatológicos, recientemente se han diseñado varios modelos experimentales de quemaduras, y así en un modelo de quemaduras en cerdos se han valorado varios marcadores inmuistoquímicos (vimentina, CD31, y KI-67), con el fin de explorar mecanismos de proliferación celular y de reparación tisular, observado el desarrollo de hiperplasia celular y reepitelización después de la fase aguda de la quemadura.<sup>54</sup> También en un modelo de escaldadura en piel de ratones se ha visto en la fase aguda una disminución del número de linfocitos, pero una semana después se ha encontrado un aumento en las células mieloides proinflamatorias.<sup>148</sup> Esta infiltración prolongada de neutrófilos en las heridas por quemadura, así como la supresión de la proliferación de linfocitos, podría estar relacionada con un aumento en los niveles séricos de TGF-beta,<sup>119,120</sup> que actúa como un inmunosupresor, suprimiendo la proliferación y diferenciación de los linfocitos B y de los linfocitos T y la formación de linfocitos T citotóxicos;<sup>155</sup> también se han encontrado alteraciones de la migración de células inmunocompetentes secundarias al incremento de citoquinas.<sup>146</sup> De otra parte, se ha relacionado el grado de profundidad de las quemaduras con respecto a la repuesta de neutrófilos, linfocitos y macrófagos, que migran al foco de la quemadura cutánea. De hecho, el estudio semicuantitativo de linfocitos CD3+ y macrófagos CD68+ ha demostrado valores distintos en quemaduras superficiales y profundas.<sup>103,119,120</sup> Estos datos sugieren una mayor elevación del número de células inmunocompetentes y de IL-6 e IFN-gamma en las quemaduras de espesor completo; especulándose en este artículo que la modulación de citoquinas proinflamatorias pudiera mejorar el tratamiento de la herida por quemaduras.<sup>119,120</sup>

En pacientes con quemaduras cutáneas graves siempre se produce una ampolla, con desprendimiento y lisis de la epidermis y en la dermis adyacente se produce un foco

necrótico central<sup>53</sup> que tiene distintas dimensiones dependiendo de la intensidad, del tiempo de exposición al agente productor, y de los diferentes mecanismos etiológicos de la quemadura.<sup>12,132</sup> La úlcera cutánea está presente en todos los casos de quemadura grave; además, en muchos casos, la inflamación necrotizante se extiende en profundidad al tejido celular subcutáneo, pudiendo afectar en ocasiones a las fascias, músculos y huesos subyacentes. Este grado de profundidad sirve para la clasificación clínica de las quemaduras.<sup>63</sup>

Para nuestro trabajo histopatológico de la presente Tesis, hemos seleccionado solo pacientes quemados con úlceras cutáneas con afectación de la dermis y, a veces, de la hipodermis, en los que estaba indicado la extirpación quirúrgica del foco ulceroso, del tejido periulceroso y del borde quirúrgico, que siempre se procura que esté realizado por tejido aparentemente sano. En la Unidad de Grandes Quemados del Hospital Universitario La Paz, el paciente quemado grave recibe un tratamiento multidisciplinar realizado por cirujanos y por médicos intensivistas, quienes determinan aquellos tratamientos coadyuvantes más idóneos para cada paciente, que suelen incluir, al igual que ocurre en otros hospitales especializados,<sup>117,153</sup> desde el soporte vital y la corrección de los desequilibrios electrolíticos y metabólicos, hasta la prevención de las complicaciones infecciosas y el tratamiento quirúrgico reparador de la superficie quemada.

En la fase aguda, una vez estabilizadas las constantes vitales y realizadas las curas pertinentes, la intervención quirúrgica debe realizarse lo más precoz posible. El tratamiento quirúrgico consiste en la limpieza y desbridamiento de la herida, con eliminación de tejidos inviables y restos necróticos, y posterior cobertura de la úlcera, utilizando para cada caso el método más adecuado: apósitos y en muchas ocasiones la realización de colgajos cutáneos y de injertos homólogos o heterólogos, o de piel artificial.<sup>59</sup> El injerto siempre hay que realizarlo sobre un tejido sano, que ya no tenga signos de necrosis aguda activa, esto es, sobre una base de un tejido inicial sano que permita y favorezca la reparación tisular. Actualmente, se han desarrollado numerosos protocolos en el tratamiento de las úlceras cutáneas por quemadura, muchos aún en fase experimental, que incluyen la utilización de



factores de crecimiento y células madre.<sup>43</sup> De este modo se pretende una doble finalidad: evitar las infecciones y procurar una óptima cicatrización.<sup>49</sup>

Existen varios estudios que han evaluado los mecanismos de la lesión histopatológica en el foco necrótico y en los tejidos cutáneos próximos a la quemadura. La mayoría de estos trabajos se han desarrollado en modelos experimentales<sup>13,116</sup> de quemaduras de distinta etiología y se han centrado sobre todo en los mecanismos de la infiltración de leucocitos polimorfonucleares en las primeras horas de la quemadura.<sup>153</sup> También existe gran número de estudios microbiológicos que evalúan la colonización por bacterias patógenas de la úlcera por quemadura, dado que las infecciones constituyen uno de los grandes problemas en el tratamiento del paciente quemado.<sup>90</sup>

Publicaciones previas centradas en modelos experimentales de quemaduras y también en pacientes quemados han demostrado que en las úlceras por quemadura se produce una necrosis coagulativa, no solo en el foco ulceroso, sino que también se puede extender a tejidos cutáneos periulcerosos; de este modo, la necrosis que destruye los fascículos de colágeno de la dermis superficial y reticular determina un edema intersticial que, partiendo del borde de la úlcera, se extiende progresivamente a los tejidos periulcerosos, determinando una respuesta inflamatoria aguda y la formación de moléculas antioxidantes, secundarias al estrés oxidativo.<sup>87,107</sup> Esta primera fase aguda de la quemadura cutánea va evolucionando hacia una fase subaguda, caracterizada por la migración a los tejidos periulcerosos de células inflamatorias crónicas, fundamentalmente linfocitos T y macrófagos.<sup>39,146</sup>

Estos mecanismos de histogénesis y fisiopatológicos de las quemaduras cutáneas son bien conocidos y constituyen la base científica de los tratamientos médicos y quirúrgicos. Sin embargo, en nuestro conocimiento no existen estudios sistematizados y cuantitativos del perfil de células inmunocompetentes –fundamentalmente linfocitos T- en el tejido periulceroso, ni tampoco su posible relación con los mecanismos de angiogénesis y linfangiogénesis de la piel quemada. El abordar estos estudios en la piel extirpada en los pacientes quemados pretende cotejar los hallazgos histopatológicos con los abundantes -y a la vez contradictorios- datos inmunológicos publicados en pacientes quemados.<sup>39,81</sup> Se ha

demostrado que en estos pacientes se produce liberación de diferentes tipos de interleucinas y moléculas TNF $\alpha$  y TGB- $\beta$ , que son moléculas proinflamatorias y de necrosis tisular;<sup>91,138</sup> además, se sabe también que hay importantes cambios en sangre periférica, que afectan fundamentalmente al número de linfocitos T circulantes.<sup>73</sup>

Aunque se sabe, asimismo, que en los tejidos periulcerosos hay infiltración de macrófagos y también puede haber algunas células cebadas,<sup>9,146</sup> en nuestro conocimiento tampoco se han realizado estudios sistematizados cuantitativos de estas células usando anticuerpos monoclonales. En el foco de las quemaduras cutáneas existe una variable infiltración de macrófagos, tal como hemos comprobado en nuestros casos, los que, además de fagocitar detritus celulares y bacterias destruidas por los leucocitos polimorfonucleares, tienen un importante papel en la remodelación tisular y participan fundamentalmente en la presentación de antígenos.<sup>39,91,146,175</sup>

Las aportaciones del presente estudio son, por una parte, la novedosa metodología de cuantificación de la inmuoexpresión de marcadores vasculares y células inmunocompetentes en distintas regiones de la biopsia cutánea; por otra parte, la novedad de abordar el estudio histopatológico de las lesiones secundarias a quemaduras cutáneas, dado que en los Servicios de Anatomía Patológica generalmente no reciben los tejidos de esfacelos cutáneos procedentes del desbridamiento de las úlceras por quemadura, porque son desechados directamente en el quirófano. Es precisamente de este tejido desechado del que nos hemos servido para la fase experimental del presente estudio.

En las biopsias cutáneas estudiadas hemos observado que en la zona adyacente a la úlcera cutánea existe mayor celularidad que la encontrada en los extremos de la piel extirpada, que en muchos casos es histológicamente normal; pero estos hallazgos, aun con la acreditada experiencia como patólogos, no dejan de ser datos subjetivos. Por ello, hemos diseñado un estudio histométrico objetivo de la piel adyacente a la úlcera por quemadura. Creemos que la aportación metodológica de la presente Tesis es completamente original, dado que no hemos encontrado en la exhaustiva bibliografía revisada una cuantificación objetiva del número de células inmunocompetentes y de vasos sanguíneos y linfáticos en las diferentes regiones de la piel extirpada en los pacientes quemados. Consideramos que el

estudio morfométrico de las muestras de piel quemada puede proporcionar datos relevantes para el mejor conocimiento de este tipo de lesión tisular.

Con todo, una de las dificultades que plantean los métodos morfométricos es diseñar el método más apto para una evaluación histopatológica. Sin duda, dentro de estos métodos son los estudios morfométricos estereológicos unos de los más precisos, porque nos proporcionan datos, que aun no siendo numéricos-dimensionales, sí son de proporcionalidad (en nuestro caso, de mayor o menor celularidad o de la superficie ocupada por los vasos) con respecto a la totalidad del tejido cuantificado.<sup>83,123,124</sup> Sin embargo, los métodos estereológicos aplicados a células inmunocompetentes inmunomarcadas con anticuerpos monoclonales son poco precisos, debido a la gran dificultad de distinción entre lo que es una célula positiva, de una célula negativa; por ello, es difícil dar datos cuantitativos de las células inmunocompetentes realmente inmunomarcadas.<sup>112</sup> Teniendo en cuenta estas consideraciones, en el presente estudio hemos preferido la aplicación del método cuantitativo directo, que permite identificar directamente el número de células inmunomarcadas por campo, usando objetivo de gran aumento y diferenciándolas de aquellas de dudoso marcaje o de aquellas que presentan un fondo de marcaje inespecífico.

Dadas las dificultades y críticas objetivas de los diferentes métodos de cuantificación en Histología, en este estudio hemos diseñado un nuevo modelo de cuantificación, en nuestro conocimiento inédito, que consiste en establecer varias regiones de extensión lineal del tejido periulceroso, desde el foco ulceroso a la zona periférica, con el fin de determinar si existe un gradiente de distribución de las células inmunocompetentes, las células cebadas y los vasos sanguíneos y linfáticos a medida que nos alejamos de la úlcera por quemadura. La razón para considerar 11 regiones de 500  $\mu$  cada región fue ajustarnos a las biopsias de menor tamaño que llegaban a nuestro laboratorio; y, si bien en ocasiones llegaban muestras de mayor tamaño, nos pareció una forma idónea de unificar criterios considerar estas 11 regiones que estaban presentes en todos los casos. De este modo, la región 1 corresponde a las primeras 500 micras de tejido adyacente al borde de la úlcera, que corresponde al tejido inflamatorio agudo. La región número 11 corresponde a la zona más periférica (5.500 micras con respecto a la úlcera), que en algunas ocasiones coincidía con el borde quirúrgico de

obtención de la biopsia. Otros métodos valiosos, incluido los denominados grupos de intensidad “en cruces o *scores*, generalmente en 4 grupos de intensidad”, se han empujado mucho en estudios de patología, pero son, sin embargo, métodos semicuantitativos subjetivos,<sup>112,139</sup> y no precisan, cuando la dispersión de datos es grande, el número exacto de células; en nuestro caso, el número exacto de linfocitos T, linfocitos B, macrófagos y de células cebadas que hay en cada una de las regiones del tejido cutáneo periulceroso.

También en esta Tesis se ha cuidado especialmente la valoración estadística de los datos obtenidos, no solo usando métodos de estadística descriptiva y paramétrica básica, sino también diseñando modelos estadísticos de tendencia, con el fin de valorar la distribución de células inmunocompetentes y de los vasos sanguíneos y linfáticos en las diferentes regiones de la biopsia cutánea; de este modo, se ha tratado de valorar si existe significación estadística de las rectas de tendencia obtenidas. Esta evaluación de tendencia de las diferentes células y vasos inmunomarcados nos ha aportado una información completamente objetiva, evitando la habitual subjetividad del patólogo cuando sugiere que “parece que existe” una determinada tendencia de expresión (creciente o decreciente) entre diferentes regiones evaluadas. En definitiva, una vez discutidos rigurosamente los diferentes métodos cuantitativos, es el momento de proceder a discutir en las biopsias de piel quemada el significado histofisiológico de las células inmunocompetentes y su relación con los mecanismos de angiogénesis y linfangiogénesis.

Los linfocitos T CD3+ son abundantes en el borde inmediatamente adyacente a la úlcera por quemadura, pero no se han encontrado en el foco necrótico de la úlcera. A medida que nos alejamos del borde de la úlcera, se observa mayor acúmulo de linfocitos CD3+, que se disponen, tanto en el intersticio del tejido conjuntivo como alrededor de los vasos sanguíneos. Estos linfocitos T CD3+ se pueden observar aislados, pero más frecuentemente se encuentran agrupados en nidos de 3 a 6 células. Algunos de estos linfocitos pueden migrar a través del epitelio.

En la superficie media y periférica de la biopsia cutánea, se observan múltiples acúmulos nodulares de linfocitos CD3+, infiltrando tanto la dermis papilar como la porción superficial de la dermis reticular. En la zona más externa correspondiente al borde quirúrgico

de la úlcera cutánea, se observan escasos linfocitos CD3+ en la dermis reticular, que se disponen aisladamente. Además, se evidencia que algunos de estos linfocitos migran a través del estrato basal de la epidermis. En la zona que coincide con el borde quirúrgico es excepcional ver acúmulos de linfocitos CD3+, sólo se objetivan algunas células inmunomarcadas aisladas. Con todo, en la piel quemada se ha constatado un incremento significativo de linfocitos CD3+ con respecto al grupo control ( $p < 0.05$ ), y este predominio de células T también se ha constatado en cicatrices hipertróficas post-quemadura.<sup>17</sup> Estos datos están en consonancia con la evidente respuesta de linfocitos T y con el incremento de interleucinas que han sido publicados en estudios de modelos experimentales de quemaduras cutáneas y oculares.<sup>121,163</sup>

El número de linfocitos CD3+ en cada una de las 11 regiones es variable, aunque no existen diferencias estadísticamente significativas cuando se compara cada región con las adyacentes; sin embargo, sí existen diferencias significativas con respecto al grupo control de piel normal. La evaluación de modelos de tendencia ha demostrado una tendencia decreciente estadísticamente significativa de linfocitos CD3+, a medida que nos alejamos del foco ulceroso principal. Este importante incremento de linfocitos T CD3+ en la piel quemada con respecto al control es consecuencia de la importante respuesta de inmunidad celular que ocurre en estos pacientes ya desde la fase aguda de la lesión.<sup>60,108</sup>

En la piel normal, los linfocitos B CD20+ son extraordinariamente escasos. En las biopsias de piel quemada también es infrecuente observarlos, por lo que su cuantificación es muy irregular en las diferentes regiones estudiadas; esto determina que no haya diferencias estadísticamente significativas entre cada región y que, por ello, no exista ninguna tendencia de distribución. Esta particular respuesta tisular en la que se constata la importante diferencia entre la infiltración de linfocitos T y linfocitos B no es exclusiva de la piel quemada; antes bien, la inmensa mayoría de las enfermedades cutáneas comportan trastornos inmunológicos en los que la respuesta tisular inflamatoria está mediada fundamentalmente por linfocitos T.<sup>17,141,143,155</sup>

Los macrófagos, tanto en la piel normal del control, como en la úlcera cutánea por quemadura han sido identificados inmunohistoquímicamente con un anticuerpo anti-CD68.

La evaluación histológica de todos los casos de piel quemada ha demostrado la presencia de numerosos macrófagos CD68+ en el foco necrótico y en el tejido periulceroso. Los macrófagos CD68+ aparecen como células aisladas, pero aún más frecuentemente se distribuyen en grupos que se extienden por la matriz extracelular de la dermis, sobre todo en las áreas con rarefacción de las fibras de colágeno secundaria al edema de la matriz extracelular. Además, en ocasiones, se ven abundantes macrófagos CD68+ que también pueden aparecer en la dermis papilar y en la vecindad de la unión dermo-epidérmica y migrar hacia la epidermis adyacente. Por último, los vasos sanguíneos de la dermis adyacente a la úlcera por quemadura pueden presentar algunos macrófagos en su luz y pared, sobre todo localizados en la adventicia vascular. Sin embargo, los casos control de piel normal contienen una mínima cantidad de macrófagos CD68+, los cuales se localizan como células aisladas inmunomarcadas en la dermis papilar y reticular y, de otra parte, la epidermis normal carece de macrófagos y de células inmunocompetentes.<sup>67,68,164</sup>

En la piel quemada, el mayor número de macrófagos CD68+ se ha cuantificado en la dermis del fondo de la úlcera y en los bordes periulcerosos, decreciendo su número a medida que nos alejamos del centro de la úlcera, de manera que existe diferencias estadísticamente significativas entre el borde de la úlcera (la región 1), con respecto a las zonas más periféricas de la biopsia cutánea (regiones 9-11). Al igual que ocurre cuando se cuantifican los linfocitos T, el número de macrófagos CD68+ es significativamente mayor en la piel quemada que en la piel normal. También el estudio de tendencia ha demostrado que el número de macrófagos CD68+ en la piel quemada muestra una tendencia decreciente estadísticamente significativa desde el centro de la úlcera hacia la periferia. Este comportamiento migratorio de los macrófagos CD68+ en las quemaduras cutáneas se puede relacionar con su fundamental participación en mecanismos inmunológicos de presentación de antígenos en el foco de la ulceración y también con la capacidad que tienen los macrófagos de participar en los mecanismos de remodelación de la matriz extracelular de la piel periulcerosa.<sup>138</sup> Será necesario dilucidar en nuevos estudios si la proporción de macrófagos M1 y de macrófagos M2,<sup>77,91</sup> tiene un comportamiento peculiar en relación con la respuesta tisular en las quemaduras cutáneas.<sup>171,173</sup>

Los estudios cuantitativos de las células cebadas triptasa+ han demostrado que son abundantes en todas las regiones estudiadas de la piel que bordea a la úlcera por quemadura, siendo especialmente numerosas en el fondo de la úlcera y tejido próximo. Las células cebadas se disponen tanto de forma aislada, como agrupadas en pequeños nidos dispersos por la matriz extracelular.<sup>70,137</sup> Nuestros resultados demuestran que el número de células cebadas en cada una de las regiones de la piel quemada es significativamente mayor que en la piel normal; sin embargo, la cuantificación de células cebadas en las diferentes regiones, no ha obtenido significación estadística, por ello la distribución de células cebadas no sigue ningún patrón de tendencia estadística.

Uno de los objetivos fundamentales de la presente Tesis Doctoral es conocer la existencia de posibles correlaciones entre la respuesta de los distintos tipos de células inmunocompetentes -linfocitos T y linfocitos B-, con respecto a las distribución de los macrófagos, dado que estos últimos tienen una importancia fundamental, no solo como células presentadoras de antígeno, sino también como células que remodelan el tejido conjuntivo de los bordes ulcerosos.<sup>77,171,173</sup> Estas correlaciones se han realizado en cada una de las 11 regiones de la piel quemada. De esta manera se ha pretendido conocer si los procesos inflamatorios son diferentes en las regiones intermedias y más periféricas (próximas al borde quirúrgico) de la biopsia cutánea.

Si bien el número de linfocitos B en la piel normal y en la piel quemada es mínimo,<sup>64</sup> se han encontrado correlaciones entre los linfocitos T y los linfocitos B en las regiones próximas a la úlcera (regiones 1 y 2). Con todo, las correlaciones estadísticas que tienen mayor valor en el conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos de las quemaduras cutáneas son las que se establecen entre los macrófagos y los linfocitos T, lo que es completamente lógico, ya que los mecanismos inmunológicos que ocurren en los pacientes quemados y también en numerosas patologías inflamatorias de la piel<sup>8,15</sup> vienen mediados fundamentalmente por una respuesta inmunológica de tipo celular.<sup>17,174</sup> En este sentido, hemos encontrado correlaciones significativas entre el número de linfocitos T y de macrófagos en el borde de la úlcera y también en la zona intermedia de la piel quemada (regiones 1, 2 y 5). Estos datos están en consonancia con estudios inmunológicos, fundamentalmente séricos, que se han

publicado en modelos experimentales en paciente con quemaduras, en los que se han encontrado cambios significativos de diferentes interleucinas y de otros reactantes de inflamación, incluidos TNF- $\alpha$  o TGF- $\beta$ .<sup>119,120,163</sup>

El estudio de las relaciones entre las células inmunocompetentes y las células cebadas tiene sentido, por cuanto los mastocitos son, al igual que los macrófagos, células coadyuvantes en los mecanismos inmunológicos<sup>28,75</sup> y además, las células cebadas participan muy directamente en la remodelación de la matriz extracelular en los focos de inflamación.<sup>125,169</sup> Nuestros datos corroboran una fuerte correlación entre el número de linfocitos T y las células cebadas triptasa+, no solo en las regiones próximas a la úlcera postquemadura, sino también en las zonas más alejadas de la biopsia cutánea, lo que sugiere que el proceso inmunológico y los mecanismos de remodelación se realizan coordinadamente de manera simultánea en la piel quemada.<sup>29,137,140</sup>

Uno de los objetivos que se plantearon en el presente estudio es la valoración de los posibles cambios que podría experimentar la microvasculatura en las áreas de piel quemada, dado que los estudios previos publicados en humanos son muy escasos y pobremente diseñados; además, en nuestro conocimiento sólo se ha publicado un trabajo poco estructurado centrado en la presencia de capilares linfáticos en la piel quemada. En esta Tesis los capilares linfáticos han sido identificado con el anticuerpo anti-D2-40<sup>85</sup> y los capilares sanguíneos con un anticuerpo anti-CD31,<sup>99,167</sup> evidenciando en ambos casos un intenso inmunomarcaje en el citoplasma de las células endoteliales. Hemos preferido usar el anticuerpo anti-CD31 al más clásico anti-CD34, pues, si bien con este anticuerpo en nuestro laboratorio tenemos mucha experiencia en la identificación de células endoteliales en mecanismos de angiogénesis en tumores,<sup>44,88,89</sup> creemos en la actualidad que su intensa expresión en el citoplasma de células dendrítica, tan abundante en la dermis normal dificultaría notoriamente la exacta cuantificación de los capilares en las biopsias cutáneas.<sup>2,123,138</sup>

Se sabe que la piel normal presenta una abundante red microvascular en la dermis papilar y reticular, donde se observan de forma predominante capilares, pero también pequeñas arteriolas y pequeñas vénulas.<sup>94</sup> Nuestros datos morfométricos demuestran que el



número de microvasos en la piel normal es bastante uniforme, sin que existan diferencias significativas en las distintas regiones estudiadas. En la zona periulcerosa se pueden observar algunos capilares dilatados con endotelio engrosado y con migración de leucocitos y de linfocitos T; también la adventicia está rodeada por una capa de células inmunocompetentes. En la zona media y en la zona de la biopsia cutánea también se identifican muy bien los microvasos de la dermis papilar, y de la dermis reticular, aunque los infiltrados inflamatorios perivasculares son mucho más escasos.

Para el estudio cuantitativo sistematizado de la microvasculatura hemos usado el programa de análisis de imagen Imagen J, que permite “disecar” exclusivamente los microvasos capilares y vénulas inmunomarcadas, y cuantificar la superficie ocupada por estos microvasos, estableciendo en cada una de las regiones estudiadas la proporción entre la superficie ocupada por los vasos, con respecto a la superficie total de la dermis. Hemos encontrado un aumento significativo del número de microvasos sanguíneos en la piel quemada respecto al control de piel normal; sin embargo, en la piel quemada no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas al cuantificar los microvasos en las diferentes regiones estudiadas. Por tanto, se puede concluir que los procesos de angiogénesis, si bien son evidentes en la piel quemada, no tienen una distribución regional, sino que el incremento de la densidad de microvasos es un proceso que va asociado a los fenómenos inmunológicos, favoreciendo una posterior reparación tisular.<sup>13,14</sup> Los procesos de angiogénesis en el borde quirúrgico de la biopsia por quemadura pueden tener una especial relevancia quirúrgica, ya que una angiogénesis exacerbada dificultaría el prendimiento de un injerto cutáneo, dando lugar a procesos patológicos de cicatrización,<sup>36,49</sup> similares a los que ocurren en la angiomatosis o en los granulomas piogénicos.<sup>71,143,144</sup>

Los estudios de los vasos linfáticos en las quemaduras cutáneas son muy escasos y solo citan brevemente la existencia de vasos linfáticos en los bordes de las úlceras cutáneas. En biopsias cutáneas de diferentes patologías han adquirido novedosa relevancia la valoración de mecanismos de linfangiogénesis, gracias a que en la actualidad se ha demostrado que los anticuerpos anti-Live 1 y anti-podoplanina (anti-D2-40) son completamente específicos de innumaraje de endotelio linfático.<sup>85</sup> En el presente estudio de los vasos linfáticos en piel

quemada hemos usado el anticuerpo anti-D2-40, ya que en estudios previos realizados en nuestro laboratorio para detectar vasos linfáticos en tumores hemos comprobado que el inmunomarcaje con la anti- podoplanina es mucho más demostrativo que con el anticuerpo anti-Live 1.

Con el anticuerpo anti-D2-40 hemos comprobado que la piel normal tiene una gran vascularización linfática, aunque la distribución de los vasos linfáticos en la piel normal difiere de la microvasculatura sanguínea, puesto que los vasos linfáticos -fundamentalmente hendiduras linfáticas, vénulas linfáticas, y capilares linfáticos- son más abundantes en la dermis media y reticular que en la dermis papilar; todo lo contrario de lo que ocurre con la microvasculatura sanguínea, mucho más abundante en la dermis papilar.<sup>76,114,134,165</sup>

Nuestros datos cuantitativos de los vasos linfáticos D2-40+ en las biopsias de pacientes con quemaduras cutáneas son similares a los encontrados en la piel normal; además, todos los datos morfométricos en las diferentes regiones estudiadas han demostrado que en la piel quemada no existen verdaderos procesos de linfoangiogénesis. Este dato conviene destacarlo, porque si bien es cierto que hay edema en la piel quemada, sobre todo en las zonas periulcerosas, frecuentemente asociado a necrosis coagulativa, no se desarrolla un verdadero linfedema,<sup>4</sup> lo cual terapéuticamente podría ser beneficioso para el paciente, pues la ausencia de mecanismos de linfoangiogénesis favorecería la integración de un implante cutáneo. Por tanto, podemos especular con que la ausencia de una verdadera linfoangiogénesis en la piel quemada podría ser un interesante dato clínico traslacional, que explicaría cómo los injertos cutáneos realizados sobre un borde quirúrgico sano o con escasa inflamación se integran con facilidad, consiguiendo de este modo una buena reparación de la úlcera cutánea por quemadura.

## CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES

**PRIMERA.** El estudio histológico de la piel que rodea al foco necrótico de la úlcera por quemadura demuestra cambios tisulares que afectan al tejido conjuntivo, a la distribución de células inmunocompetentes cutáneas y a los vasos sanguíneos y linfático de la dermis.

**SEGUNDA.** EL estudio cuantitativo de las células inmunocompetentes evidencia un incremento de linfocitos T CD3+ con respecto a la piel normal. Además, se ha comprobado una tendencia significativa decreciente del número de linfocitos T CD3+ en las zonas alejadas del foco ulceroso; sin embargo, no se encuentran diferencias del número absoluto de linfocitos T CD3+ en las distintas regiones histológicas estudiadas. Respecto a la cuantificación de los linfocitos B CD20+, no se han encontrado diferencias entre ninguna de las regiones de la piel quemada, ni tampoco con respecto al control de piel normal.

**TERCERA.** El número de macrófagos CD68+ es significativamente mayor en el tejido cutáneo quemado que en la piel normal. En la piel que rodea directamente a la úlcera necrótica, se ha constatado un número significativamente mayor de macrófagos CD68+ que en la zona periférica, demostrándose una disminución progresiva y significativa ( $p < 0.05$ ) del número de macrófagos en la zona de extirpación de la biopsia (región 9-11). Así mismo, se ha demostrado un modelo de tendencia decreciente y significativa del número de macrófagos cutáneos a medida que nos alejamos de la úlcera por quemadura.

**CUARTA.** La identificación inmunohistoquímica de triptasa en el citoplasma de células cebadas ha permitido demostrar una disminución significativa de los mastocitos en las biopsias cutáneas por quemadura, con respecto a la piel normal; sin embargo, no se han encontrado diferencias del número de células cebadas triptasa+ en las distintas regiones estudiadas, ni tampoco la adecuación a un determinado modelo de tendencia.

**QUINTA.** Se han identificado los microvasos sanguíneos CD31+ y los capilares y vénulas linfáticas D2-40 en todas las regiones de la piel que bordea a la úlcera cutánea por quemadura, y se ha objetivado un incremento significativo con respecto a la microvasculatura sanguínea y linfática de la piel normal. Sin embargo, cuando se comparan cada una de las regiones de la biopsia de piel quemada, no se han encontrado diferencias

significativas de la distribución de los microvasos sanguíneos y linfáticos, y así mismo, tampoco se ha constatado un patrón de tendencia estadística.

**SEXTA.** En la piel próxima a la úlcera por quemadura, las valoraciones histométricas demuestran una correlación positiva y significativa entre los linfocitos T, B y los macrófagos, pero no con respecto a las células cebadas; mientras que, las células cebadas, en las zonas media y externa de la biopsia, sí presentan una correlación positiva con los linfocitos T, los macrófagos y las células cebadas.

**SÉPTIMA.** Las lesiones de cutáneas por quemadura demuestran una respuesta importante de células inmunocompetentes, macrófagos y células cebadas y un incremento de la microvasculatura sanguínea y linfática que persiste en los bordes de la biopsia cutánea. Estos datos podrían sugerir una respuesta beneficiosa en los mecanismos de reparación y cicatrización tisular posterior a la resección quirúrgica de la úlcera por quemadura.

## RESUMEN

## RESUMEN

En los pacientes con quemaduras graves cutáneas, las alteraciones clínicas e inmunológicas son bien conocidas. También se han descritos las lesiones histológicas generales, centradas en la formación de las ampollas, de las úlceras necróticas y de la necrosis coagulativa, asociada a infiltrados inflamatorios inespecíficos. Sin embargo, no existen estudios previos acerca de la distribución cuantitativa, tanto de las células inmunocompetentes como de los vasos sanguíneos y linfáticos en la dermis periulcerosa. Tampoco se han evaluado las relaciones entre los linfocitos T y B, los macrófagos y las células cebadas, así como los mecanismos de angiogénesis y linfoangiogénesis en la biopsia cutánea de pacientes quemados.

En el presente estudio se han revisado 47 biopsias, correspondientes a 37 de pacientes quemados y 10 muestras de piel sana. Se han evaluado inmunohistoquímicamente y se han cuantificado morfométricamente los linfocitos T CD3+, linfocitos B CD20+, los macrófagos CD68+ y las células cebadas triptasa+; así como la expresión de CD31+ en las células endoteliales de la microvasculatura sanguínea y la expresión de D2-40+ en las células endoteliales de los capilares linfáticos.

En la dermis que rodea a las úlceras cutáneas postquemadura, se han evaluado 11 regiones correlativas de 500  $\mu$  cada una, siendo la región 1 la zona más próxima a la úlcera y la región 11 la zona más periférica de la biopsia. El conteo de células inmunomarcadas se realizó directamente en el microscopio, utilizando un objetivo de 40x, de otra parte, se calculó el área ocupada por los microvasos sanguíneos y linfáticos, en relación con el área de la dermis de cada región evaluada, usando el programa Image J.

La respuesta inmunológica es diferente en la porción central de la quemadura, (donde se produce una ulceración y necrosis completa del tejido), que en los bordes de piel que rodean a la ulceración. Hemos evidenciado una variable cantidad de macrófagos CD68+ en la zona periulcerosa; así como una gran cantidad de linfocitos T CD3+, siendo muy escasos los infiltrados de linfocitos B CD20+; además, los linfocitos T CD3+, los macrófagos CD68+ y las células cebadas son, en general, más abundantes en las regiones centrales de las biopsias

estudiadas. En la mayoría de las regiones, se han obtenido correlaciones fuertemente significativas cuando se comparan los linfocitos T y los macrófagos con las células cebadas. También se ha encontrado un aumento significativo de la superficie ocupada por los capilares sanguíneos y linfáticos, en las biopsias de pacientes quemados, con respecto al control. Todos estos datos sugieren una relación de la respuesta de las células inmunocompetentes y de las células cebadas con los procesos de angiogénesis sanguínea y linfática en la dermis de los pacientes quemados.

**Palabras Clave:** Quemaduras, Piel, Inflamación cutánea, Linfocitos, Macrófagos, Células Cebadas, Angiogénesis, Linfangiogénesis.



## SUMMARY

## SUMMARY

In patients with severe skin burns, clinical and immunological alterations are well known. General histological findings, such as the formation of blisters, necrotic ulcers and coagulative necrosis, associated with nonspecific inflammatory infiltrates, have also been described. However, there are no previous studies on the quantitative distribution of both the immunocompetent cells and the blood and lymphatic vessels in the dermis surrounded the skin ulcer. The relationships between T and B lymphocytes, macrophages and mast cells, as well as the mechanisms of angiogenesis and lymphangiogenesis in the biopsy of the skin of burned patients have not been evaluated.

In the present study, 47 cutaneous biopsies were reviewed, 37 corresponding to burned patients and 10 samples of healthy skin. These were evaluated immunohistochemically and the CD3+ T-lymphocytes, CD20+ B-lymphocytes, CD68+ macrophages, and tryptase+ mast cells have been quantified morphometrically; the expression of CD31+ in the endothelial cells of the blood microvasculature and the expression of D2-40+ in the endothelial cells of the lymphatic capillaries were also quantified.

In the dermis surrounding the post-burn skin ulcers, 11 correlative regions of 500  $\mu$  have been evaluated, being region 1 the area closest to the ulcer and region 11 the most peripheral area of the biopsy. The counting of immunomarked cells was performed directly under the microscope, using a 40x objective; on the other hand, the area occupied by the blood and lymphatic microvessels was calculated, in relation to the area of the dermis of each evaluated region, using the program Image J.

The immune response is different in the central area of the burn, (where complete tissue ulceration and necrosis occurs), than in the skin edges surrounding the ulceration. We have evidenced a variable amount of CD68+ macrophages in the periulcerated zone; a large number of CD3+ T-lymphocytes, with very few infiltrates of CD20+ B-lymphocytes was also found; In addition, CD3+ T-lymphocytes, CD68+ macrophages and mast cells are, in general, more abundant in the central areas of the biopsies studied. In most regions, strongly

significant correlations have been obtained when comparing T-lymphocytes and macrophages with mast cells. A significant increase in the surface area occupied by blood and lymphatic capillaries has also been found in the biopsies of burned patients, with respect to the control. All these data suggest a relationship between the response of the immunocompetent cells and mast cells with the processes of blood and lymphatic angiogenesis in the dermis of burned patients.

**Key Words:** Burns, skin, cutaneous inflammation, Lymphocytes, Macrophages, Mast Cells, Angiogenesis, Lymphangiogenesis.

## REFERENCIAS

1. **Abali AE, Karakayali H, Ozdemir BH, Bayraktar N, Abbas OL, Haberal M.** Destructive pulmonary effects of smoke inhalation and simultaneous alterations in circulating IL-6, TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$  levels at different burn depths: an experimental study on rats. *J Burn Care Res* 2013;34:334-341.
2. **Abbas OL, Özatik O, Terzi YK, Özatik FY, Nar R, Turna G.** The Notch signaling system is involved in the regulation of reparative angiogenesis in the zone of stasis. *J Burn Care Res* 2017;38: e923-e933.
3. **Ahmad A, Druzhyna N, Szabo C.** Cystathionine-gamma-lyase deficient mice are protected against the development of multiorgan failure and exhibit reduced inflammatory response during burn. *Burns* 2017;43:1021-1033.
4. **Alitalo K.** The lymphatic vasculature in disease. *Nat Med* 2011;17:1371-1380.
5. **Andrzejewska E, Niewiadomska H, Nawrot E.** Mechanism of impaired immunologic response to bacterial antigens in burn wounds in children. *Pediatr Surg Int* 2000;16:85-88.
6. **Anwar U, Majumder S, Austin O, Phipps AR.** Changing pattern of adult burn referrals to a regional burns centre. *J Burn Care Res* 2007;28:299-305.
7. **Arriazu R, Durán E, Pozuelo JM, Santamaria L.** Expression of lysophosphatidic acid receptor 1 and relation with cell proliferation, apoptosis, and angiogenesis on preneoplastic changes induced by cadmium chloride in the rat ventral prostate. *PLoS One* 2013;8:e57742.
8. **Bangert C, Brunner PM, Stingl G.** Immune functions of the skin. *Clin Dermatol* 2011;29:360-376.
9. **Bayliss J, Delarosa S, Wu J, Peterson JR, Eboda ON, Su GL, Hemmila M, Bergkvist M, Henricson J, Iredahl F, Tesselaar E, Sjöberg F, Farnebo S.** Assessment of microcirculation of the skin using Tissue Viability Imaging: A promising technique for detecting venous stasis in the skin. *Microvasc Res* 2015;101:20-25.
10. **Bessey PQ, Arons RR, Dimaggio CJ, Yurt RW.** The vulnerabilities of age: burns in children and older adults. *Surgery* 2006;140:705-717.
11. **Bhat S, Milner S.** Antimicrobial peptides in burns and wounds. *Curr Protein Pept Sci* 2007;8:506-520.
12. **Brusselaers N, Monstrey S, Vogelaers D, Hoste E, Blot S.** Severe burn injury in europe: a systematic review of the incidence, etiology, morbidity, and mortality. *Crit Care* 2010;14:R188.
13. **Busuioc CJ, Popescu FC, Mogoşanu GD, Lascăr I, Pirici I, Pop OT, Mogoantă L.** Angiogenesis assessment in experimental third degree skin burns: a histological and immunohistochemical study. *Rom J Morphol Embryol* 2011;52:887-895.
14. **Busuioc CJ, Popescu FC, Mogoşanu GD, Pârvănescu H, Streba L, Mogoantă L.** Histological and immunohistochemical study of cutaneous angiogenesis process in experimental third-degree skin burns treated with allograft. *Rom J Morphol Embryol*. 2012;53:1061-1067.
15. **Butzelaar L, Schooneman DP, Soykan EA, Talhout W, Ulrich MM, van den Broek LJ, Gibbs S, Beelen RH, Mink van der Molen AB, Niessen FB.** Inhibited early immunologic response is associated with hypertrophic scarring. *Exp Dermatol* 2016;25:797-804.
16. **Cairns B, Maile R, Barnes CM, Frelinger JA, Meyer AA.** Increased Toll-like receptor 4 expression on T cells may be a mechanism for enhanced T cell response late after burn injury. *J Trauma* 2006;61:293-299.

17. Castagnoli C, Trombotto C, Ondeï S, Stella M, Calcagni M, Magliacani G, Alasia ST. Characterization of T-cell subsets infiltrating post-burn hypertrophic scar tissues. *Burns* 1997;23:565-572.
18. Cerqueira MT, Pirraco R, Marques AP. Stem cells in skin wound healing: are we there yet? *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2016;5:164-175.
19. Chipp E, Walton J, Gorman D, Moïemen NS. Adherence to referral criteria for burns in the emergency department. *Eplasty* 2008;8:e26.
20. Cleland H. Thermal burns-assessment and acute management in the general practice setting. *Aust Fam Physician* 2012;41:372-375.
21. Colohan SM. Predicting prognosis in thermal burns with associated inhalational injury: a systematic review of prognostic factors in adult burn victims. *J Burn Care Res* 2010;31:529-539.
22. Connolly KL, Chaffins M, Ozog D. Vascular patterns in mature hypertrophic burn scars treated with fractional CO2 laser. *Lasers Surg Med* 2014;46:597-600.
23. Correia-Sá I, Serrão P, Marques M, Vieira-Coelho MA. Hypertrophic scars: are vitamins and inflammatory biomarkers related with the pathophysiology of wound healing? *Obes Surg* 2017;27:3170-3178.
24. Curtis BJ, Radek KA. Cholinergic regulation of keratinocyte innate immunity and permeability barrier integrity: new perspectives in epidermal immunity and disease. *J Invest Dermatol* 2012;132:28-42.
25. D'Elia M, Patenaude J, Dupras C, Bernier J. T cells from burn-injured mice demonstrate a loss of sensitivity to glucocorticoids. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2010;299:E299-307.
26. Demling RH. The burn edema process: current concepts. *J Burn Care Rehabil* 2005;26:207-227.
27. Deng H, Chai JK. The effects and mechanisms of insulin on systemic inflammatory response and immune cells in severe trauma, burn injury, and sepsis. *Int Immunopharmacol* 2009;9:1251-1259.
28. Dong X, Chen J, Zhang Y, Cen Y. Mast cell chymase promotes cell proliferation and expression of certain cytokines in a dose-dependent manner. *Mol Med Rep* 2012;5:1487-1490.
29. Dong X, Xu T, Ma S, Wen H. Expression and activity levels of chymase in mast cells of burn wound tissues increase during the healing process in a hamster model. *Exp Ther Med* 2015;9:2190-2194.
30. dos Santos JS, Monte-Alto-Costa A. Caffeic acid phenethyl ester improves burn healing in rats through anti-inflammatory and antioxidant effects. *J Burn Care Res* 2013;34:682-688.
31. Duan X, Yarmush D, Leeder A, Yarmush ML, Mitchell RN. Burn-induced immunosuppression: attenuated T cell signaling independent of IFN-gamma- and nitric oxide-mediated pathways. *J Leukoc Biol* 2008;83:305-313.
32. Duke JM, Randall SM, Wood FM, Boyd JH, Fear MW. Burns and long-term infectious disease morbidity: A population-based study. *Burns* 2017;43:273-281.
33. Eser T, Kavalci C, Aydogan C, Kayipmaz AE. Epidemiological and cost analysis of burn injuries admitted to the emergency department of a tertiary burn center. *Springerplus* 2016;5:1411.
34. Evers LH, Bhavsar D, Mailänder P. The biology of burn injury. *Exp Dermatol* 2010;19:777-783.

35. Fan X, Liu Z, Jin H, Yan J, Liang HP. Alterations of dendritic cells in sepsis: featured role in immunoparalysis. *Biomed Res Int* 2015;2015:903720.
36. Fantinati MS, Mendonça DE, Fantinati AM, Santos BF, Reis JC, Afonso CL, Vinaud MC, Lino Rde S Jr. Low intensity ultrasound therapy induces angiogenesis and persistent inflammation in the chronic phase of the healing process of third degree burn wounds experimentally induced in diabetic and non-diabetic rats. *Acta Cir Bras* 2016;31:463-471.
37. Fantus RJ, Nathens A. NTDB® data points. Annual report 2008: V8 for 2008. *Bull Am Coll Surg* 2009;94:70-71.
38. Farina JA, Rosique MJ, Rosique RG. Curbing inflammation in burn patients. *Int J Inflamm* 2013;2013:15645.
39. Fayazov AD, Shukurov SL, Shukurov BI, Sultanov BC, Namazov AN, Ruzimuratov D. A disorders of the immune system in severely burned patients. *Ann Burns Fire Disasters* 2009;22:121-130.
40. Fernández-Morales E, Gálvez-Alcaraz L, Fernández-Crehuet-Navájas J, Gómez-Gracia E, Salinas Martínez J. Epidemiology of burns in Málaga, Spain. *Burns* 1997;23:323-332.
41. Foubert P, Gonzalez AD, Teodosescu S, Berard F, Doyle-Eisele M, Yekkala K, Tenenhaus M, Fraser JK. Adipose-derived regenerative cell therapy for burn wound healing: A comparison of two delivery methods. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2016;5:288-298.
42. François S, Eder VV, Belmokhtar K, Machet MC, Douay L, Gorin NC, Benderitter M, Alain CA. Synergistic effect of human bone morphogenic protein-2 and mesenchymal stromal cells on chronic wounds through hypoxia-inducible factor-1  $\alpha$  induction. *Sci Rep* 2017;7:4272.
43. Ghieh F, Jurjus R, Ibrahim A, Geagea AG, Daouk H, El Baba B, Chams S, Matar M, Zein W, Jurjus A. The use of stem cells in burn wound healing: A review. *Biomed Res Int* 2015;2015:684084.
44. Gómez-Raposo C, Mendiola M, Barriuso J, Casado E, Hardisson D, Redondo A. Angiogenesis and ovarian cancer. *Clin Transl Oncol* 2009;11:564-571.
45. Grant C, Chudakova DA, Itinteang T, Chibnall AM, Brasch HD, Davis PF, Tan ST. Expression of embryonic stem cell markers in keloid-associated lymphoid tissue. *J Clin Pathol* 2016;69:643-646.
46. Greenhalgh DG. Sepsis in the burn patient: a different problem than sepsis in the general population. *Burns Trauma* 2017;5:23.
47. Guo J, Nguyen A, Banyard DA, Fadavi D, Toranto JD, Wirth GA, Paydar KZ, Evans GR, Widgerow AD. Stromal vascular fraction: A regenerative reality? Part 2: Mechanisms of regenerative action. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2016;69:180-188.
48. Guo Y, Yang Z, Wu S, Xu P, Peng Y, Yao M. Inhibition of IRF8 Negatively Regulates Macrophage Function and Impairs Cutaneous Wound Healing. *Inflammation* 2017;40:68-78.
49. Hacker S, Mittermayr R, Nickl S, Haider T, Lebherz-Eichinger D, Beer L, Mitterbauer A, Leiss H, Zimmermann M, Schweiger T, Keibl C, Hofbauer H, Gabriel C, Pavone-Gyöngyösi M, Redl H, Tschachler E, Mildner M, Ankersmit HJ. Paracrine factors from irradiated peripheral blood mononuclear cells improve skin regeneration and angiogenesis in a porcine burn model. *Sci Rep* 2016;6:25168.
50. Hamed S, Ullmann Y, Egozi D, Keren A, Daod E, Anis O, Kabha H, Belokopytov M, Ashkar M, Shofti R, Zaretsky A, Schlesinger M, Teot L, Liu PY. Topical erythropoietin treatment

- accelerates the healing of cutaneous burn wounds in diabetic pigs through an aquaporin-3-dependent mechanism. *Diabetes* 2017;66:2254-2265.
51. Held M, Rahmanian-Schwarz A, Rothenberger J, Schiefer J, Janghorban Esfahani B, Schaller HE, Jaminet P. Alteration of biomechanical properties of burned skin. *Burns* 2015;41:789-795.
  52. Hertelendy J, Reumuth G, Simons D, Stoppe C, Kim BS, Stromps JP, Fuchs PC, Bernhagen J, Pallua N, Grieb G. Macrophage migration inhibitory factor a favorable marker in inflammatory diseases? *Curr Med Chem* 2017. [Epub ahead of print]
  53. Hettiaratchy S, Dziewulski P. ABC of burns: pathophysiology and types of burns. *BMJ* 2004;328:1427-1429.
  54. Hirth DA, Singer AJ, Clark RA, McClain SA. Histopathologic staining of low temperature cutaneous burns: comparing biomarkers of epithelial and vascular injury reveals utility of HMGB1 and hematoxylin phloxine saffron. *Wound Repair Regen* 2012;20:918-927.
  55. Honnegowda TM, Padmanabha Udupa EG, Rao P, Kumar P, Singh R. Superficial burn wound healing with intermittent negative pressure wound therapy under limited access and conventional dressings. *World J Plast Surg* 2016;5:265-273.
  56. Hop MJ, Polinder S, van der Vlies CH, Middelkoop E, van Baar ME. Costs of burn care: A systematic review. *Wound Repair Regen* 2014;22:436-450.
  57. Iredahl F, Löfberg A, Sjöberg F, Farnebo S, Tesselaar E. Non-invasive measurement of skin microvascular response during pharmacological and physiological provocations. *PLoS One* 2015;13;10:e0133760.
  58. Ito A, Yamada N, Yoshida Y, Morino S, Yamamoto O. Myofibroblastic differentiation in atypical fibroxanthomas occurring on sun-exposed skin and in a burn scar: an ultrastructural and immunohistochemical study. *J Cutan Pathol* 2011;38:670-676.
  59. Jabir S, Frew Q, Magdum A, El-Muttardi N, Philp B, Dziewulski P. Microvascular free tissue transfer in acute and secondary burn reconstruction. *Injury* 2015;46:1821-1827.
  60. Jewo PI, Fadeyibi IO. Progress in burns research: a review of advances in burn pathophysiology. *Ann Burns Fire Disasters* 2015;28:105-115.
  61. Jiang L, Yao YM, Sheng ZY. The role of regulatory T cells in the pathogenesis of sepsis and its clinical implication. *J Interferon Cytokine Res* 2012;32:341-349.
  62. Kallinen O, Maisniemi K, Böhling T, Tukiainen E, Koljonen V. Multiple organ failure as a cause of death in patients with severe burns. *J Burn Care Res* 2012;33:206-211.
  63. Kearns RD, Holmes JH, Cairns BA. Burn injury: what's in a name? Labels used for burn injury classification: a review of the data from 2000-2012. *Ann Burns Fire Disasters* 2013;26:115-120.
  64. Khan WN, Wright JA, Kleiman E, Boucher JC, Castro I, Clark ES. B-lymphocyte tolerance and effector function in immunity and autoimmunity. *Immunol Res* 2013;57:335-353.
  65. Kim A, Lang T, Xue M, Wijewardana A, Jackson C, Vandervord J. The role of Th-17 cells and  $\gamma\delta$  T-cells in modulating the systemic inflammatory response to severe burn injury. *Int J Mol Sci* 2017;18. pii:E758.
  66. Kokhaei P, Barough MS, Hassan ZM. Cimetidine effects on the immunosuppression induced by burn injury. *Int Immunopharmacol* 2014;22:273-276.
  67. Korkmaz HI, Krijnen PAJ, Ulrich MMW, de Jong E, van Zuijlen PPM, Niessen HWM. The role of complement in the acute phase response after burns. *Burns* 2017;43:1390-1399.



- 
68. Korkmaz HI, Ulrich MMW, van Wieringen WN, Vlig M, Emmens RW, Meyer KW, Sinnige P, Krijnen PAJ, van Zuijlen PPM, Niessen HWM. The local and systemic inflammatory response in a pig burn wound model with a pivotal role for complement. *J Burn Care Res* 2017;38:e796-e806.
  69. Krebsbach PH, Cederna PS, Wang SC, Xi C, Levi B. Adenosine triphosphate hydrolysis reduces neutrophil infiltration and necrosis in partial-thickness scald burns in mice. *J Burn Care Res* 2014;35:54-61.
  70. Kwak IS, Park SY, Choi YH, Cho SI, Yang YS, Cho YS, Choi MG, Seo CH, Park CW, Kim HO. Clinical and histopathological features of post burn pruritus. *J Burn Care Res* 2016;37:343-349.
  71. Langer S, Beescho C, Ring A, Dorfmann O, Steinau HU, Spindler N. A new in vivo model using a dorsal skinfold chamber to investigate microcirculation and angiogenesis in diabetic wounds. *GMS Interdiscip Plast Reconstr Surg DGPW* 2016;5:Doc09.
  72. Latenser BA. Critical care of the burn patient: The first 48 hours *Critical Care Medicine* 2009;37:2819-2826.
  73. Lebedev MJ, Krizhanova MA, Vilkov SA, Sholkina MN, Vyasmina ES, Baryshnikov AJ, Novikov VV. Peripheral blood lymphocytes immunophenotype and serum concentration of soluble HLA class I in burn patients. *Burns* 2003;29:123-128.
  74. Li H, Fu X. Mechanisms of action of mesenchymal stem cells in cutaneous wound repair and regeneration. *Cell Tissue Res* 2012;348:371-377.
  75. Lieberman P, Garvey LH. Mast Cells and Anaphylaxis. *Curr Allergy Asthma Rep* 2016;16:20.
  76. Ling S, Lin H, Liang L, Xu J, Xu C, Zhao W, Liu Z. Development of new lymphatic vessels in alkali-burned corneas. *Acta Ophthalmol* 2009;87:315-322.
  77. Liu YC, Zou XB, Chai YF, Yao YM. Macrophage polarization in inflammatory diseases. *Int J Biol Sci* 2014;10:520-529.
  78. Luan YY, Yao YM, Sheng ZY. Update on the immunological pathway of negative regulation in acute insults and sepsis. *J Interferon Cytokine Res* 2012;32:288-298.
  79. MacConmara MP, Maung AA, Fujimi S, McKenna AM, Delisle A, Lapchak PH, Rogers S, Lederer JA, Mannick JA. Increased CD4+ CD25+ T regulatory cell activity in trauma patients depresses protective Th1 immunity. *Ann Surg* 2006;244:514-523.
  80. MacConmara MP, Tajima G, O'Leary F, Delisle AJ, McKenna AM, Stallwood CG, Mannick JA, Lederer JA. Regulatory T cells suppress antigen-driven CD4 T cell reactivity following injury. *J Leukoc Biol* 2011;89:137-147.
  81. Mannick JA, Rodrick ML, Lederer JA. The immunologic response to injury. *J Am Coll Surg* 2001;193:237-244.
  82. Maranda EL, Rodriguez-Menocal L, Badiavas EV. Role of mesenchymal stem cells in dermal repair in burns and diabetic wounds. *Curr Stem Cell Res Ther* 2017;12:61-70.
  83. Martín R, Sneige N, Vásquez M, Aragón-Flores M, Martín G, Marrón C, Santamaría L. Stereologic estimates of volume-weighted mean nuclear volume in aspiration smears of ductal breast carcinoma. Correlation with cytologic grade, tumor size and lymph node status. *Anal Quant Cytol Histol* 1999;21:185-193.

84. **Martín-Duce A, Velasco-Martín JP, Regadera J, Fernández M, Alemany S, Martínez FO, Helming L, Gordon S.** Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol* 2009;27:451-483.
85. **Martínez-Iglesias O, Olmeda D, Alonso-Merino E, Gómez-Rey S, González-López AM, Luengo E, Soengas MS, Palacios J, Regadera J, Aranda A.** The nuclear corepressor 1 and the thyroid hormone receptor  $\beta$  suppress breast tumor lymphangiogenesis. *Oncotarget* 2016;7:78971-78984.
86. **Mathews AL, Cheng MH, Muller JM, Lin MC, Chang KW, Chung KC.** Cost analysis of 48 burn patients in a mass casualty explosion treated at Chang Gung Memorial Hospital. *Injury* 2017;48:80-86.
87. **Méndez-López I, Bomfim GH, Musial DC, Arranz-Tagarro JA, Velasco-Martín JP, Regadera J, Jurkiewicz NH, Jurkiewicz A, García AG, Padín FJ.** Altered mitochondrial function, capacitative calcium entry and contractions in the aorta of hypertensive rats. *J Hypertens* 2017;35:1594-1608.
88. **Mendiola M, Barriuso J, Redondo A, Mariño-Enríquez A, Madero R, Espinosa E, Vara JA, Sánchez-Navarro I, Hernández-Cortés G, Zamora P, Pérez-Fernández E, Miguel-Martín M, Suárez A, Palacios J, González-Barón M, Hardisson D.** Angiogenesis-related gene expression profile with independent prognostic value in advanced ovarian carcinoma. *PLoS One* 2008;3:e4051.
89. **Mendiola M, Martínez-Marin V, Herranz J, Heredia V, Yébenes L, Zamora P, Castelo B, Pinto A, Miguel M, Díaz E, Gámez A, Fresno JA, Ramírez de Molina A, Hardisson D, Espinosa E, Redondo A.** Predictive value of angiogenesis-related gene profiling in patients with HER2-negative metastatic breast cancer treated with bevacizumab and weekly paclitaxel. *Oncotarget* 2016;7:24217-74227.
90. **Merchant N, Smith K, Jeschke MG.** An ounce of prevention saves tons of lives: Infection in burns. *Surg Infect (Larchmt)* 2015;16:380-387.
91. **Minutti CM, Knipper JA, Allen JE, Zaiss DM.** Tissue-specific contribution of macrophages to wound healing. *Semin Cell Dev Biol* 2017;61:3-11.
92. **Mochimaru H, Usui T, Yaguchi T, Nagahama Y, Hasegawa G, Usui Y, Shimmura S, Tsubota K, Amano S, Kawakami Y, Ishida S.** Suppression of alkali burn-induced corneal neovascularization by dendritic cell vaccination targeting VEGF receptor 2. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:2172-2177.
93. **Motegi SI, Ishikawa O.** Mesenchymal stem cells: The roles and functions in cutaneous wound healing and tumor growth. *J Dermatol Sci* 2017;86:83-89.
94. **Nagy JA, Benjamin L, Zeng H, Dvorak AM, Dvorak HF.** Vascular permeability, vascular hyperpermeability and angiogenesis. *Angiogenesis* 2008;11:109-119.
95. **Ni WW, Cao MD, Huang W, Meng L, Wei JF.** Tryptase inhibitors: a patent review. *Expert Opin Ther Pat* 2017;27:919-928.
96. **Nielson CB, Duethman NC, Howard JM, Moncure M, Wood JG.** Burns: Pathophysiology of systemic complications and current management. *J Burn Care Res* 2017;38:469-481.
97. **Nizamoglu M, Tan A, Vickers T, Segaren N, Barnes D, Dziwulski P.** Cold burn injuries in the UK: the 11-year experience of a tertiary burns centre. *Burns Trauma* 2016;4:36.

98. Norbury W, Herndon DN, Tanksley J, Jeschke MG, Finnerty CC. Infection in burns. *Surg Infect (Larchmt)* 2016;17:250-255.
99. Ogawa R, Akaishi S. Endothelial dysfunction may play a key role in keloid and hypertrophic scar pathogenesis, keloids and hypertrophic scars may be vascular disorders. *Med Hypotheses* 2016;96:51-60.
100. Osuka A, Hanschen M, Stoecklein V, Lederer JA. A protective role for inflammasome activation following injury. *Shock* 2012;37:47-55.
101. Patil NK, Luan L, Bohannon JK, Guo Y, Hernandez A, Fensterheim B, Sherwood ER. IL-15 superagonist expands mCD8+ T, NK and NKT cells after burn injury but fails to improve outcome during burn wound infection. *PLoS One* 2016;11:e0148452.
102. Plichta JK, Droho S, Curtis BJ, Patel P, Gamelli RL, Radek KA. Local burn injury impairs epithelial permeability and antimicrobial peptide barrier function in distal unburned skin. *Crit Care Med* 2014;42:420-431.
103. Popescu FC, Mogoşanu GD, Busuioc CJ, Pârvănescu H, Lascăr I, Mogoantă L. Macrophage response in experimental third-degree skin burns treated with allograft. Histological and immunohistochemical study. *Rom J Morphol Embryol* 2012;53:1027-1036.
104. Posluszny JA Jr, Muthumalaiappan K, Kini AR, Szilagyi A, He LK, Li Y, Gamelli RL, Shankar R. Burn injury dampens erythroid cell production through reprioritizing bone marrow hematopoietic response. *J Trauma* 2011;71:1288-1296.
105. Quemaduras [Internet]. Organización Mundial de la Salud: Centro de prensa, Notas descriptivas [Agosto 2017]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs365/es/>
106. Rabiolo A, Bignami F, Rama P, Ferrari G, Vessel J. A new tool for semiautomatic measurement of corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015;56:8199-8206.
107. Rada P, Rojo AI, Offergeld A, Feng GJ, Velasco-Martín JP, González-Sancho JM, Valverde ÁM, Dale T, Regadera J, Cuadrado A. WNT-3A regulates an Axin1/NRF2 complex that regulates antioxidant metabolism in hepatocytes. *Antioxid Redox Signal* 2015;22:555-571.
108. Rani M, Schwacha MG. The composition of T-cell subsets are altered in the burn wound early after injury. *PLoS One* 2017;12:e0179015.
109. Rani M, Zhang Q, Scherer MR, Cap AP, Schwacha MG. Activated skin  $\gamma\delta$  T-cells regulate T-cell infiltration of the wound site after burn. *Innate Immun* 2015;21:140-150.
110. Rani M, Zhang Q, Schwacha MG. Gamma delta T cells regulate wound myeloid cell activity after burn. *Shock* 2014;42:133-141.
111. Ravat F, Payre J, Peslages P, Fontaine M, Sens N. Burn: An inflammatory process. *Pathol Biol (Paris)* 2011;59:e63-72.
112. Regadera J, Codesal J, Paniagua R, González-Peramato P, Nistal M. Immuno-histochemical and quantitative study of interstitial and intratubular Leydig cells in normal men, cryptorchidism, and Klinefelter's syndrome. *J Pathol* 1991;164:299-306.
113. Rendon JL, Choudhry MA. Th17 cells: critical mediators of host responses to burn injury and sepsis. *J Leukoc Biol* 2012;92:529-538.

114. Rho CR, Choi JS, Seo M, Lee SK, Joo CK. Inhibition of lymphangiogenesis and hemangiogenesis in corneal inflammation by subconjunctival Prox1 siRNA injection in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2015;56:5871-5879.
115. Rivas V, Carmona R, Muñoz-Chápuli R, Mendiola M, Nogués L, Reglero C, Miguel-Martín M, García-Escudero R, Dorn GW 2nd, Hardisson D, Mayor F Jr, Penela P. Developmental and tumoral vascularization is regulated by G protein-coupled receptor kinase 2. *J Clin Invest* 2013;123:4714-4730.
116. Romana-Souza B, Nascimento AP, Monte-Alto-Costa A. Low-dose propranolol improves cutaneous wound healing of burn-injured rats. *Plast Reconstr Surg* 2008;122:1690-1699.
117. Rowan MP, Cancio LC, Elster EA, Burmeister DM, Rose LF, Natesan S, Chan RK, Christy RJ, Chung KK. Burn wound healing and treatment: review and advancements. *Crit Care* 2015;19:243-251.
118. Ruocco V, Ruocco E, Piccolo V, Brunetti G, Guerrera LP, Wolf R. The immunocompromised district in dermatology: A unifying pathogenic view of the regional immune dysregulation. *Clin Dermatol* 2014;32:569-576.
119. Sakallioğlu AE, Basaran O, Karakayali H, Ozdemir BH, Yucel M, Arat Z, Haberal M. Interactions of systemic immune response and local wound healing in different burn depths: an experimental study on rats. *J Burn Care Res* 2006;27:357-366.
120. Sakallioğlu AE, Başaran O, Ozdemir BH, Arat Z, Yücel M, Haberal M. Local and systemic interactions related to serum transforming growth factor-beta levels in burn wounds of various depths. *Burns* 2006;32:980-985.
121. Salimi Elizei S, Poormasjedi-Meibod MS, Li Y, Baradar Jalili R, Ghahary A. Effects of kynurenine on CD3+ and macrophages in wound healing. *Wound Repair Regen* 2015;23:90-97.
122. Sánchez JL, Perepérez B, Bastida JL, Martínez MM. Cost-utility analysis applied to the treatment of burn patients in a specialized center. *Arch Surg* 2007;142:50-57.
123. Santamaría L, Ingelmo I, Ruiz J, Teba F. Study of the distribution of microvessels in normal and pathologic prostate using an information-based similarity analysis. *J Microsc* 2011;243:303-314.
124. Santamaría L, Martín R, Martín JJ, Alonso L. Stereologic estimation of the number of neuroendocrine cells in normal human prostate detected by immunohistochemistry. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2002;10:275-281.
125. Santos FX, Arroyo C, García I, Blasco R, Obispo JM, Hamann C, Espejo L. Role of mast cells in the pathogenesis of postburn inflammatory response: reactive oxygen species as mast cell stimulators. *Burns* 2000;26:145-147.
126. Sanz-García C, Ferrer-Mayorga G, González-Rodríguez A, Valverde AM, Martín-Duce A, Velasco-Martín JP, Regadera J, Fernández M, Alemany S. Sterile inflammation in acetaminophen-induced liver injury is mediated by Cot/tpl2. *J Biol Chem* 2013;288:15342-15351.
127. Saraf MK, Herndon DN, Porter C, Toliver-Kinsky T, Radhakrishnan R, Chao T, Chondronikola M, Sidossis LS. Morphological Changes in subcutaneous white adipose tissue after severe burn injury. *J Burn Care Res* 2016;37:e96-103.

128. Sayed S, Bakry R, El-Shazly M, El-Oteify M, Terzaki S, Fekry M. Effect of major burns on early and late activating markers of peripheral blood T lymphocytes. *Ann Burns Fire Disasters* 2012;25:17-21.
129. Schneider DF, Palmer JL, Tulley JM, Kovacs EJ, Gamelli RL, Faunce DE. Prevention of NKT cell activation accelerates cutaneous wound closure and alters local inflammatory signals. *J Surg Res* 2011;171:361-373.
130. Schwacha MG, Holland LT, Chaudry IH, Messina JL. Genetic variability in the immune-inflammatory response after major burn injury. *Shock*. 2005;23:123-128.
131. Shen H, de Almeida PE, Kang KH, Yao P, Chan CW. Burn injury triggered dysfunction in dendritic cell response to TLR9 activation and resulted in skewed T cell functions. *PLoS One* 2012;7:e50238.
132. Sheppard NN, Hemington-Gorse S, Shelley OP, Philp B, Dziewulski P. Prognostic scoring systems in burns: a review. *Burns* 2011;37:1288-1295.
133. Sheridan RL, Chang P. Acute burn procedures. *Surg Clin North Am* 2014;94:755-764.
134. Shi W, Ming C, Liu J, Wang T, Gao H. Features of corneal neovascularization and lymphangiogenesis induced by different etiological factors in mice. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2011;249:55-67.
135. Shupp JW, Nasabzadeh TJ, Rosenthal DS, Jordan MH, Fidler P, Jeng JC. A review of the local pathophysiologic bases of burn wound progression. *J Burn Care Res* 2010;31:849-873.
136. Soria-Castro I, Krzyzanowska A, Pelaéz ML, Regadera J, Ferrer G, Montoliu L, Rodríguez-Ramos R, Fernández M, Alemany S. Cot/tpl2 (MAP3K8) mediates myeloperoxidase activity and hypernociception following peripheral inflammation. *J Biol Chem* 2010;285:33805-33815.
137. Souza HR, de Azevedo LR, Possebon L, Costa SS, Iyomasa-Pilon MM, Oliani SM, Girol AP. Heterogeneity of mast cells and expression of Annexin A1 protein in a second degree burn model with silver sulfadiazine treatment. *PLoS One* 2017;12:e0173417.
138. Stefater JA, Rao S, Bezold K, Aplin AC, Nicosia RF, Pollard JW, Ferrara N, Lang RA. Macrophage Wnt-Calcineurin-Flt1 signaling regulates mouse wound angiogenesis and repair. *Blood* 2013;121:2574-2578.
139. Suárez-Quian CA, Martínez-García F, Nistal M, Regadera J. Androgen receptor distribution in adult human testis. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:350-358.
140. Succar J, Douaiher J, Lancerotto L, Li Q, Yamaguchi R, Younan G, Pejler G, Orgill DP. The role of mouse mast cell proteases in the proliferative phase of wound healing in microdeformational wound therapy. *Plast Reconstr Surg* 2014;134:459-467.
141. Tan EM, Blackwell MG, Dunne JC, Marsh R, Tan ST, Itinteang T. Neuropeptide Y receptor 1 is expressed by B and T lymphocytes and mast cells in infantile haemangiomas. *Acta Paediatr* 2017;106:292-297.
142. Tan HB, Danilla S, Murray A, Serra R, El Dib R, Henderson TO, Wasiak J. Immunonutrition as an adjuvant therapy for burns. *Cochrane Database Syst Rev* 2014:CD007174.
143. Tan EM, Itinteang T, Chudakova DA, Dunne JC, Marsh R, Brasch HD, Davis PF, Tan ST. Characterisation of lymphocyte subpopulations in infantile haemangioma. *J Clin Pathol* 2015;68:812-818.

144. Tan ST, Wallis RA, He Y, Davis PF. Mast cells and hemangioma. *Plast Reconstr Surg* 2004;113:999-1011.
145. Taylor SL, Lee D, Nagler T, Lawless MB, Curri T, Palmieri TL. A validity review of the National Burn Repository. *J Burn Care Res* 2013;34:274-280.
146. Tian M, Qing C, Niu Y, Dong J, Cao X, Song F, Ji X, Lu S. The relationship between inflammation and impaired wound healing in a diabetic rat burn model. *J Burn Care Res* 2016;37:115-124.
147. Tobalem M, Harder Y, Rezaeian F, Wettstein R. Secondary burn progression decreased by erythropoietin. *Crit Care Med* 2013;41:963-971.
148. Tschöp J, Martignoni A, Reid MD, Adediran SG, Gardner J, Noel GJ, Ogle CK, Neely AN, Caldwell CC. Differential immunological phenotypes are exhibited after scald and flame burns. *Shock* 2009;31:157-163.
149. Valvis SM, Waithman J, Wood FM, Fear MW, Fear VS. The immune response to skin trauma is dependent on the etiology of injury in a mouse model of burn and excision. *J Invest Dermatol* 2015;135:2119-2128.
150. van de Goot F, Krijnen PA, Begieneman MP, Ulrich MM, Middelkoop E, Niessen HW. Acute inflammation is persistent locally in burn wounds: a pivotal role for complement and C-reactive protein. *J Burn Care Res* 2009;30:274-280.
151. van den Berg LM, de Jong MA, Witte Ld, Ulrich MM, Geijtenbeek TB. Burn injury suppresses human dermal dendritic cell and Langerhans cell function. *Cell Immunol* 2011;268:29-36.
152. Venter NG, Marques RG, Santos JS, Monte-Alto-Costa A. Use of platelet-rich plasma in deep second- and third-degree burns. *Burns* 2016;42:807-814.
153. Venter NG, Monte-Alto-Costa A, Marques RG. A new model for the standardization of experimental burn wounds. *Burns* 2015;41:542-547.
154. Vinish M, Cui W, Stafford E, Bae L, Hawkins H, Cox R, Toliver-Kinsky T. Dendritic cells modulate burn wound healing by enhancing early proliferation. *Wound Repair Regen* 2016;24:6-13.
155. Wang J, Jiao H, Stewart TL, Shankowsky HA, Scott PG, Tredget EE. Increased TGF-beta-producing CD4+ T lymphocytes in postburn patients and their potential interaction with dermal fibroblasts in hypertrophic scarring. *Wound Repair Regen* 2007;15:530-539.
156. Wang XQ, Song F, Liu YK. Hypertrophic scar regression is linked to the occurrence of endothelial dysfunction. *PLoS One* 2017;12:e0176681.
157. Wang K, Wang DC, Feng YQ, Xiang-Feng L. Changes in cytokine levels and CD4+/CD8+ T cells ratio in draining lymph node of burn wound. *J Burn Care Res* 2007;28:747-753.
158. Wang G, Xia Z. Monocyte subsets and their differentiation tendency after burn injury. *Front Med* 2013;7:397-400.
159. Widgerow AD, King K, Tocco-Tussardi I, Banyard DA, Chiang R, Awad A, Afzel H, Bhatnager S, Melkumyan S, Wirth G, Evans GR. The burn wound exudate-an under-utilized resource. *Burns* 2015;41:11-17.
160. Williams DW, Engle EL, Shirk EN, Queen SE, Gama L, Mankowski JL, Zink MC, Clements JE. Splenic damage during SIV infection: role of T-cell depletion and macrophage polarization and infection. *Am J Pathol* 2016;186:2068-2087.

161. Wright EH, Harris AL, Furniss D. Cooling of burns: Mechanisms and models. *Burns* 2015;41:882-889.
162. Xiao M, Li L, Li C, Zhang P, Hu Q, Ma L, Zhang H. Role of autophagy and apoptosis in wound tissue of deep second-degree burn in rats. *Acad Emerg Med* 2014;21:383-391.
163. Xin Y, Wan DH, Wang X, Gao XJ, Xu XJ, Ju XL, Li AM. Effect of tumor necrosis factor-induced protein 8 on T-cell-mediated immunity in mice after thermal injury. *J Biol Regul Homeost Agents* 2016;30:777-784.
164. Yan D, Liu S, Zhao X, Bian H, Yao X, Xing J, Sun W, Chen X. Recombinant human granulocyte macrophage colony stimulating factor in deep second-degree burn wound healing. *Medicine (Baltimore)* 2017;96:e6881.
165. Yan H, Qi C, Ling S, Li W, Liang L. Lymphatic vessels correlate closely with inflammation index in alkali burned cornea. *Curr Eye Res* 2010;35:685-697.
166. Yao L, Li ZR, Su WR, Li YP, Lin ML, Zhang WX, Liu Y, Wan Q, Liang D. Role of mesenchymal stem cells on cornea wound healing induced by acute alkali burn. *PLoS One* 2012;7:e30842.
167. Yoshida S, Lee JO, Nakamura K, Suzuki S, Hendon DN, Kobayashi M, Suzuki F. Lineage CD34+CD31+ cells that appear in association with severe burn injury are inhibitory on the production of antimicrobial peptides by epidermal keratinocytes. *PLoS One* 2014;9:e82926.
168. You K, Yang HT, Kym D, Yoon J, HaejunYim, Cho YS, Hur J, Chun W, Kim JH. Inhalation injury in burn patients: establishing the link between diagnosis and prognosis. *Burns* 2014;40:1470-1475.
169. Younan G, Suber F, Xing W, Shi T, Kunori Y, Abrink M, Pejler G, Schlenner SM, Rodewald HR, Moore FD Jr, Stevens RL, Adachi R, Austen KF, Gurish MF. The inflammatory response after an epidermal burn depends on the activities of mouse mast cell proteases 4 and 5. *J Immunol* 2010;185:7681-7690.
170. Zhang H, Sun B. Pleiotropic regulations of neutrophil receptors response to sepsis. *Inflamm Res* 2017;66:197-207.
171. Zhu Z, Ding J, Ma Z, Iwashina T, Tredget EE. Systemic depletion of macrophages in the subacute phase of wound healing reduces hypertrophic scar formation. *Wound Repair Regen* 2016;24:644-656.
172. Zhu Z, Ding J, Ma Z, Iwashina T, Tredget EE. Alternatively activated macrophages derived from THP-1 cells promote the fibrogenic activities of human dermal fibroblasts. *Wound Repair Regen* 2017;25:377-388.
173. Zhu Z, Ding J, Tredget EE. The molecular basis of hypertrophic scars. *Burns Trauma* 2016;4:2.
174. Zu H, Li Q, Huang P. Expression of T reg subsets on intestinal T cell immunity and endotoxin translocation in porcine sepsis after severe burns. *Cell Biochem Biophys* 2014;70:1699-1704.
175. Zuo KJ, Medina A, Tredget EE. Important developments in burn care. *Plast Reconstr Surg* 2017;139:120e-138e.